

Ph.D. értekezés

**Hatékony módszerek *Fusarium* fajok trichotecén-vázas toxinjainak
(DON, NIV), szteroid- és zsírsavprofiljának vizsgálatára és a gombafertőzőtség
objektív meghatározására**

Készítette:

LAMPER CSILLA

Témavezető:

Prof. Dr. Mesterházy Ákos
egyetemi magántanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar

2001

TARTALOMJEGYZÉK

	oldalszám
BEVEZETÉS	1
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
1.1. Mikotoxinok	4
1.1.1. A mikotoxinokról általában	4
1.1.2. A mikotoxinok rendszerezése, anyagcsereutak	4
1.2. Toxintermelő gombák	7
1.2.1. Legfontosabb képviselőik	7
1.2.2. A <i>Fusarium</i> fajok általános jellemzése	8
1.2.3. A <i>Fusarium</i> fajok növényegészségügyi jelentősége	11
1.2.3.1. A búza kalászfuzariózisa	11
1.2.3.2. A gazdanövény szerepe a betegség kialakulásában	12
1.2.3.3. Környezeti tényezők	13
1.2.3.4. A vegyszeres védekezés lehetőségei	15
1.3. A <i>Fusarium</i> fajok által termelt mikotoxinok	15
1.3.1. Epoxitrichotecének	16
1.3.2. Zearalenon, α , β zearalenol	17
1.4. A <i>Fusarium</i> fajok által szintetizált mikotoxinok műszeres analitikai vizsgálatának módszerei	18
1.4.1. Az analitikai eljárások alapelvei	18
1.4.2. Elválasztástechnikai módszerek	20
1.4.2.1. Vékonyrétegekromatográfia (TLC)	20
1.4.2.2. Gázkromatográfia (GC)	20
1.4.2.3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	21
1.4.2.4. Kapilláris elektroforézis (CE)	23
1.4.2.5. Tömegspektrometriás detektálással kapcsolt elválasztástechnikai módszerek (GC/MS, HPLC/MS)	24
1.4.3. Immunkémiai módszerek	25
1.4.3.1. Radio-immun-meghatározás (RIA)	26
1.4.3.2. Enzimhez kötött immun-szorbens analízis (ELISA)	26

1.5. Mikotoxikózisok és a mikotoxinoktól származó egészségkárosodások lehetőségei	27
1.5.1. Humán mikotoxikózis	27
1.5.2. Állati mikotoxikózis	29
1.6. A gomba biomassa és a toxintartalom előrejelezésének lehetőségei	30
 2. KÍSÉRLETI RÉSZ	 35
2.1. Anyagok és módszerek	35
2.1.1. Az extraháláshoz és a műszeres analitikai vizsgálatokhoz felhasznált vegyszerek	35
2.1.2. A mesterséges fertőzéshez felhasznált <i>Fusarium</i> izolátumok	35
2.1.3. Az inokulumok előállításának módja	36
2.1.4. A kísérletsorozatba vont búzafajták	36
2.1.5. A mesterséges inokuláció menete	37
2.2. A kalász és szemfertőzöttség vizuális meghatározása (bonitálás)	37
2.3. Búzaszem őrlemények extrakciója és DON tartalmának meghatározása HPLC - vel	37
2.3.1. A DON extrakciója búzaszem őrleményekből	37
2.3.2. A DON RP-HPLC/UV meghatározásának körülményei	38
2.3.3. Kalibráció	39
2.4. A DON és NIV meghatározása búza mintákból CE módszerrel	41
2.4.1. A DON és NIV extrakciója búzaszem őrleményekből	41
2.4.2. A CE meghatározás körülményei	41
2.5. Az ergoszterin extrakciója búzából, származékképzése és GC/MS analízise	42
2.5.1. Az ergoszterin extrakciója búzaszem őrleményekből	42
2.5.2. A GC/MS meghatározás körülményei	42
2.5.3. Kalibráció	44
2.6. <i>Fusarium</i> fajok és izolátumok zsírsav és szteroid profiljának együttes GC/MS (EI, SIM) meghatározása	45
2.6.1. A kísérletsorozatba vont <i>Fusarium</i> izolátumok	45
2.6.2. A zsírsavak és szteroidok extrakciója különböző <i>Fusarium</i> fajokból és izolátumokból	46

2.6.3. A GC/MS meghatározás körülményei	46
2.6.4. Kalibráció	47
3. AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE	49
3.1. Gyors mintaelőkészítési és HPLC mérési módszer a DON meghatározására	49
3.2. Búzaszemek DON szennyezettsége, valamint szem- és kalászfertőzöttsége közötti kapcsolat elemzése	52
3.3. Új CE eljárás a DON és NIV együttes meghatározására	54
3.4. A <i>Fusarium</i> fertőzött búzaszemek ergoszterin és DON tartalmának, valamint szemfertőzöttségének vizsgálata és a közöttük lévő korrelációk	58
3.5. Fertőzött búzaminták ergoszterin tartalom alapján történő minőségi besorolása	62
3.6. Különböző <i>Fusarium</i> fajok és izolátumok szteroid és zsírsav profilja	64
4. ÖSSZEFOGLALÁS	67
IRODALOMJEGYZÉK	73

Rövidítések jegyzéke

ABTS: 2,2"-azino-di-3-etil-benzthiazolin-6-szulfonát
ACN: acetonitril
API-ES: atmoszférikus nyomású elektroporlasztásos ionizáció
APCI: atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
BSTFA: N,O-bis (trimetilszilil) trifluoracetamid
C8: oktilszilika
C18: oktadecilszilika
CE: kapilláris elektroforézis
CFU: fungális telepszám
CI: kémiai ionizáció
DAS: diacetoxiszcirpenol
DEFT: mikroszkópikus detektálás
DON: dezoxinivalenol, vomitoxin
3-AcDON: 3- acetil-dezoxinivalenol
15-AcDON: 15-acetil-dezoxinivalenol
ECD: elektron befogásos detektor
EI: elektronütköztetési ionizáció
ELISA: enzimhez kötött immun-szorbens analízis
FHB: kalászfertőzöttség
FL: fluoreszcenciás detektor
FID: lángionizációs detektor
F-X: fuzarenon-X toxin
GC: gázkromatográfia
GK Sgv - NB x MM-S3: GK Ságvári - Nobeoka Bozu x GK Mini Manó-Sumey 3
GK Zugoly x Réka-NB: GK Zugoly x Réka-Nobeoka Bozu
GLP: Jó Laboratóriumi Gyakorlat
HACCP: Veszélyek Elemzése Kritikus Irányítási Pontok
HFB: heptafluorvajsav
HFBA: heptafluorvajsav anhidrid
HFBI: heptafluorbutirilimidazol
HMDS: hexametildiszilazán
HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

HPTLC: nagyhatékonyságú vékonyrétegekromatográfia
HSD: hidroxiszteroid hidrogenáz
HT-2: HT-2 toxin
IA: immun-affinitás
MAE: mikrohullámú extrakció
MALDI: mátrixszal elősegített lézerdeszorpciós ionizáció
MEKC: micelláris elektrokinetikus kromatográfia
MeOH: metanol
MS: tömegspektrometria
MTL: maximálisan eltűrhető szint
m/z: tömeg/töltés
NIV: nivalenol
RI: refraktometriás detektálás
RIA: radio-immun-meghatározás
RP-HPLC: fordított fázisú-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
S3: Sumey 3
S3-81.60 x Kincső: Sumey3 - 81.60 x GK Kincső
SCAN: pásztázó ion figyelési mód
Sgv-NB x MM-S3: GK Ságvári - Nobeoka Bozu x GK Mini Manó-Sumey 3
SIM: kiválasztott ion figyelési mód
SPE: szilárd-fázisú extrakció
T-2: T-2 toxin
TCD: hővezetőképességi detektor
TLC: vékonyrétegekromatográfia
TMB: tetrametilbenzidin
TMCS: trimetilklórszilán
TMS: trimetilszilil
TMSI: trimetilszililimidazol
TOF: repülési idő tömeganalizátor
ZEA: zearalenon, F-2 toxin
UV: ultraibolya

BEVEZETÉS

A mezőgazdasági szektorban, a növénytermesztés során is egyre inkább előtérbe kerül a megfelelő minőség garantálása, mely elengedhetetlen az állattenyésztés gazdaságossága, valamint az élelmiszeripari termékek megbízhatósága szempontjából.

Az egészségügyi kockázattól mentes végtermékek előállítása érdekében a teljes technológiai láncot felügyelet alatt kell tartani (takarmány-feldolgozók, malmok, élelmiszeripar, stb.) egészen a végtermékek forgalombahozataláig. A megfelelő minőség mindig az adott felhasználási céltól függ (fehérjetartalom, szénhidráttartalom, sütési minőség stb.), ugyanakkor az alacsony vagy nulla toxintartalom, valamint a kismértékű mikrobiológiai szennyezettség alapvető követelmény. A felhasználási céltól függetlenül a növényi eredetű élelmiszer alapanyagok által előidézett egészségügyi kockázatot a minimális szintre kell csökkenteni. Az elmúlt húsz év kutatómunkája eredményeként lényegesen többet tudunk a különböző gombategységek esetén szintetizálódó mikotoxinokról, hatásmechanizmusukról és veszélyességükről. Az analitikai eljárások erőteljes fejlődése lehetővé tette e másodlagos anyagcseretermékek kvalitatív és kvantitatív meghatározását.

A kalászosok a Föld népességének legfontosabb élelmiszernövényei, amelyeket számos gomba kórokozó, kártevő és más betegség fenyeget. Az évente kieső termésmennyiség, világméretekben csak tonnamilliókkal fejezhető ki. Világszerte és hazánkban is egyre nagyobb problémát jelent a kalászos gabonafélék *Fusarium* fajok okozta megbetegedése. A *Fusarium* fajok közül a legnagyobb fertőzőképességgel a *Fusarium graminearum* és *Fusarium culmorum* bír. A búza termesztés tekintetében Magyarországon végzett több évtizedes felmérések is elsősorban e két faj által előidézett megbetegedésekről adnak számot, melyek több szempontból is súlyos veszteségeket okoznak az agrárgazdaságnak.

- A legszembetűnőbbek a mennyiségi veszteségek. A járványos években akár a teljes termésmennyiség megsemmisülhet, de átlagosan is 10-20 % kieséssel számolhatunk.
- A mennyiségi károkon túlmenően jelentős minőségromlás is jelentkezik, pl. a lisztek sütőipari értékének csökkenése, a keményítő degradálódása, az állattenyésztés gazdaságosságát csökkentő egységnyi súlygyarapodásra eső takarmány-felhasználás növekedése.

- Az infekció eredményeképpen szintetizálódó másodlagos anyagcseretermékek közül a mikotoxinok [deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV)] egészségkárosító hatásával is számolnunk kell mind humán, mind állategészségügyi vonatkozásban. A toxintartalmú, állati eredetű élelmiszerek humán ételmezésben történő felhasználása további közegészségügyi kockázattal járhat, mert a trichotecén-vázás mikotoxinok immunrendszert is károsító hatása miatt a járványok megelőzése céljából különböző antibiotikumos kezeléseket alkalmaznak, ami a tápláléklánc révén, humán vonatkozásban is új, antibiotikum-rezisztens kórokozó törzsek megjelenéséhez vezethet.
- A fentieken túlmenően a vetőmagérték csökkenése (búza, kukorica, hüvelyesek stb.) illetve a szaporítóanyag károsodása adott esetben olyan szintet érhet el, hogy a fertőzött terméket a továbbszaporításból ki kell zárni.

A problémák megoldásának egyik lehetősége a *Fusarium* rezisztens genotípusok nemesítése, figyelembe véve a vegyszeres védekezés, a környezeti tényezők, valamint az alkalmazott agrotechnikai eljárások hatásait is. A megfelelő minőségű genotípus garantálásának ez a módja azonban rendkívül hosszadalmas (10-15 év), ezért e mellett más megoldásokat is előtérbe kell helyezni. A *Fusariumokkal* szembeni teljes rezisztencia még ily módon sem garantálható, ezért a megbetegedés következtében jelenlévő mikotoxinok kimutatása rendkívül fontos feladat.

A penészgombák által termelt mikotoxinok mennyiségi meghatározására számos analitikai módszer áll rendelkezésre, de ezek általában hosszadalmasak és költségigényesek, ugyanakkor a reprodukálható mérések kidolgozása nélkülözhetetlen eleme lesz a 2002. január 1.-vel az élelmiszeriparban kötelezően működtetendő **Veszélyek Elemzése Kritikus Irányítási Pontok** (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) rendszernek. A HACCP rendszer és vele összefüggésben a prediktív mikrobiológia lehetővé teszi az egészségügyi kockázat kiküszöbölését, illetve minimális szintre csökkentését.

Kutatómunkám során célul tűztem ki olyan jól reprodukálható, kevésbé költségigényes, gyors, sorozatvizsgálatok céljait is kielégítő műszeres analitikai (HPLC) eljárás kidolgozását (különös tekintettel a mintatisztítás lépéseire), mely az élelmiszeripari és takarmánykeverő üzemek esetében a feldolgozásra kerülő alapanyagok mikotoxin szennyezettségéről pontos felvilágosítást adhat. A szem-, kalászfertőzöttség valamint a

DON tartalom alakulását a *Fusarium*okkal szemben különböző rezisztenciával rendelkező búzafajták esetében teszteltem.

A *Fusarium* fajok egy része a DON mellett más trichotecén-vázas, kisebb mennyiségben előforduló mikotoxinokat is - a leggyakrabban nivalenolt (NIV) - termelhet. Ezen két mikotoxin kémiai szerkezete rendkívül hasonló és RP-HPLC módszert alkalmazva a két komponens közel eluálódik egymáshoz (Szűcs és Bartók 1995), sőt búza extraktumok esetén a NIV együtt eluálódik egyes mátrix komponensekkel, amelyek a pontos kvantitatív meghatározását megnehezítik. A 90-es évek elején az elválasztástechnika egy új hatékony eljárással, a kapilláris elektroforézissel (CE) bővült. Ez az eljárás nagy hatékonyságát a kapilláris gázkromatográfiánál már jól ismert és bevált magas tányérszámú ömlesztett kvarc kapillárisoknak köszönheti. A legfejlettebb kapilláris elektroforézis készülékek a megfelelő töltetlen illetve töltött oszlopokkal alkalmasak kapilláris elektroforézis, kapilláris gélelektroforézis, kapilláris izoelektromos fókuszálás, kapilláris izotachoforézis, micelláris elektrokinetikus kromatográfia és a legújabban kapilláris elektrochromatográfia végrehajtására is. Lehetőségünk nyílt a Hewlett-Packard Magyarország Kft. demonstrációs CE készülékét kipróbálni és a néhány hónapos munka során új elválasztási módszereket kidolgozni.

A szántóföldeken bekövetkező *Fusarium*ok okozta megbetegedések megjelenését követően a gomba biomassza mennyiségének előrejelzése céljából olyan módszert kívántam kidolgozni, mely az ergoszterin tartalom kvantitatív meghatározásán alapul és melynek tükrében előre tudjuk jelezni a gomba/gombák által szintetizált mikotoxin/mikotoxinok mennyiségét is. A kísérletek fókuszába a szakirodalomban publikált, műszeres analitikai módszerekkel meghatározott ergoszterin és DON tartalom összefüggésvizsgálatán túlmenően, e két paraméter, valamint a vizuálisan megállapítható szemfertőzöttségi értékek közötti kapcsolat keresése került. Az ergoszterintartalom alapján kialakított minőségi kategóriák (Schnürer 1995, francia szabvány, AFINOR) hazai adaptálási lehetőségeit illetve gyakorlati hasznosításának lehetőségeit is meg kívántam vizsgálni, az általam mért mikotoxin és szemfertőzöttségi adatok alátámasztásával.

Tekintettel arra, hogy az ergoszterin tartalom meghatározása során a fertőzésekhez felhasznált *Fusarium* izolátumok kromatogramjai egyéb szterolok jelenlétét is mutatták, a szterol és zsírsav profil együttes felvételével az egyes izolátumok kemotaxonómiai azonosításának lehetőségét is megvizsgáltam.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Mikotoxinok

1.1.1. A mikotoxinokról általában

A mikroszkópikus gombák a természetben -így a takarmányokban is- nagy számban fordulnak elő. Szerepük a szerves anyagok lebontásában nélkülözhetetlen. A gombák növekedésük és szaporodásuk során a környezetükből felvett szerves anyagok felhasználásával ún. elsődleges anyagcseretermékeket szintetizálnak. A mikotoxinok (gombamérgek) a fonalgombák által extracellulárisan kiválasztott, változatos kémiai szerkezetű másodlagos anyagcseretermékek, melyek a magasabbrendűekre (növények, állatok, ember) nézve káros hatást fejtenek ki (mikotoxikózis), utóbbiakban elsődlegesen enterális tüneteket okozva. A szervezetben a toxinok bizonyos átalakuláson, metabolizáción (oxidáció, redukció, bontás, szintézis) mennek keresztül, melynek következtében még toxikusabb, biológiailag aktívabb vegyület keletkezhet, pl. zearalenon (ZEA, F2 toxin) → zearalenol átalakulás. Természetesen számolni kell az alacsonyabbrendű élőlényekre gyakorolt hatással is -alga, protozoon, gomba- melyek közül kiemelendők az antibiotikus hatások. A mikotoxikózisok szempontjából a penészgombák a legjelentősebbek, a kalaposgombák előfordulása a takarmányok esetében elhanyagolható. A mikotoxinok kémiaiilag rendkívül stabil vegyületek, így a fertőzött gabonafélék fizikai (hőközlés, nagy nyomás) illetve kémiai módszerekkel történő detoxikációja ez idáig nem vezetett megfelelő eredményre (Wolf-Hall et al. 1999). A gombák mikotoxin termelése szempontjából a nedvességtartalom, a hőmérséklet, a pH, valamint a stresszhatások, mint a nagy szárazság vagy a csapadékos időjárás, továbbá az egyéb gombák és baktériumok jelenléte is meghatározó (Varga 1999, Scott 1984, Téren és mtsai 1990, Benett 1995, Varga et al. 1999).

1.1.2. A mikotoxinok rendszerezése, anyagcsereutak

A mikotoxinok csoportosítása történhet a magasabbrendűekre gyakorolt farmakológiai hatásmechanizmusuk (1. táblázat), kémiai szerkezeti felépítésük (1. ábra) és bioszintézisük alapján (2. ábra). Természetesen az eddig azonosított, rendkívül nagyszámú gombafaj (pl. *Fusariumok*: 15-20 nemzetség 80-100 faja) valamint a ma már ismert másodlagos gomba anyagcseretermékek száma és nagyfokú változatossága (kb. 1000) a

rendszerézést nehezékké teszi. Számolnunk kell azzal, hogy az egy gombanemzetségbe tartozó fajok eltérő szerkezetű toxinokat szintetizálhatnak, míg taxonómiaiilag távol álló fajokra azonos toxinprofil lehet a jellemző (Téren 1990, Sweeney et al. 1999).

<i>Hatásmechanizmus</i>	<i>Fontosabb mikotoxinok</i>
hepatotoxikus, hepatokarcinogén	aflatoxinok, szterigmatocisztin
teratogén	aflatoxinok, ochratoxinok, rubratoxin B
neurotoxikus	patulin, ciklopiazonsav
immunszuppresszív	aflatoxinok, ochratoxinok, <i>trichotecének</i>
dermatotoxikus	<i>trichotecének</i>
emetikus	<i>deoxinivalenol (DON, vomitoxin)</i>
ösztrogén	<i>zearalenon (ZEA)</i>
tremorgén	fumitremogének, penitrem A
fotoszenzitizáló	sporidezminek, viomellein
hallucinogén	ergotoxinok
nefrotoxikus	ochratoxinok, citrinin

1. táblázat. A mikotoxinok legfontosabb farmakológiai hatásmechanizmusai

furanofuránok: aflatoxinok, szterigmatocisztin

szubsztituált piron és hidroxanton vegyületek: Kojisav csoport, szekalonsav csoport

szubsztituált kinonok: fumigatin, viomellein

telítetlen laktonok: patulin, ochratoxin A, B, C, rubratoxin

grizeofulvin és mollicellin vegyületek: grizeofulvin, geodoxin

epoxitrichotecének: nivalenol, deoxinivalenol, T-2 toxin, fuzarenon-X

policiklikus szubsztituált monomer indolvegyületek: ciklopiazonsav, penitrem

ciklikus peptidek: fumitremogén, brevianamid, gliotoxin B

laktámok: teuazonsav, viridikatin

ciklikus polipeptidek: aszperkolorin A, malformin A1

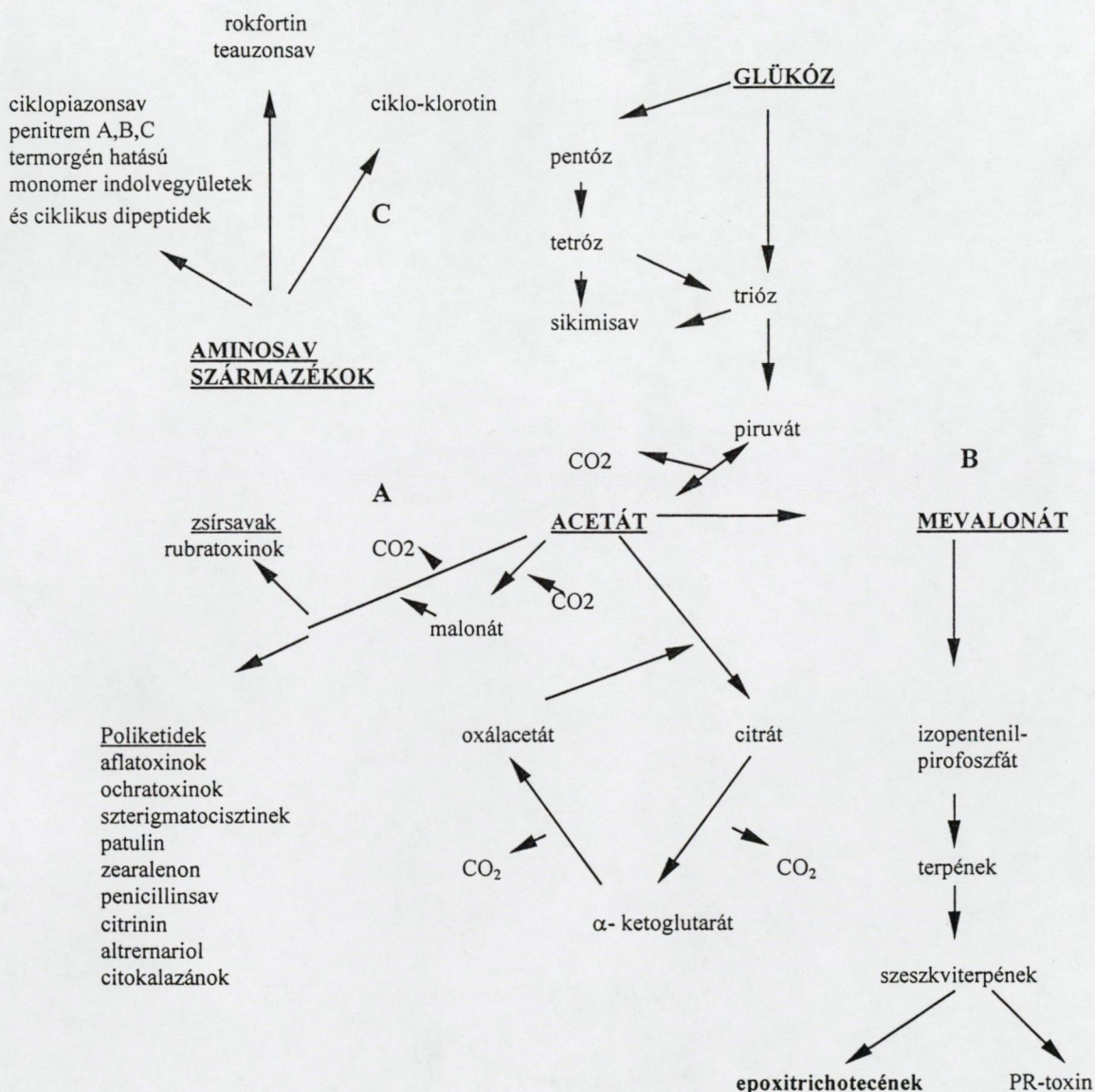
citokalazánok: citokalazin K, C

makrociklusos laktonok: zearalenon (F-2)

1. ábra. A mikotoxinok kémiai szerkezet szerinti csoportosítása és néhány példa

A bioszintézis alapján történő csoportosítás:

- a/ A mikotoxinok nagy része acetyl- és malonyl-CoA kondenzációjával vezethető le (A anyagcsereút)
- b/ A mevalonát anyagcsereútból származtatható szeszkviterpén típusú mikotoxinok (B anyagcsereút)
- c/ Az aminosavakból származtatható toxinok csoportja (N-heterociklikus és ciklikus polipeptidek (C anyagcsereút))



2. ábra. A mikotoxinok bioszintézise (elsődleges és másodlagos anyagcsereutak)

1.2. Toxintermelő gombák

1.2.1. Legfontosabb képviselők

A mikotoxinokat szintetizáló gombák közül azokat, amelyek szaporodásukhoz magasabb nedvességtartalmat (20 % felett) igényelnek, *szántóföldi penészeknek*, míg az ennél jóval alacsonyabb víztartalom mellett is életképes penészeket *raktári penészeknek* nevezzük. A mikotoxinokat szintetizáló szántóföldi penészgombák közül toxikológiai szempontból a legjelentősebbek a *Fusariumok*, de adott esetben *Alternaria* fajok is szóba jöhetnek, míg a raktári penészek közül a legismertebbek az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok.

A *Fusariumok* által termelt mikotoxinok tekintetében fontos megjegyezni, hogy ugyanazon toxint több, különböző gombafaj is képes előállítani, míg egy gombafaj gyakran többféle mikotoxint is szintetizál. A *Fusariumok* esetében, amennyiben a betakarítás és raktározás nem jár együtt a víztartalom csökkenésével, a gomba szaporodása a tárolás során is folytatódik. A *Fusariumok* által szintetizált mikotoxinok elsősorban az epoxitrichotecének (mintegy 48 ismert trichotecén) és rezolcilsav laktonok (jelenleg 12 ismert származék, Chelkowski 1989) közé sorolhatóak, melyek részletes bemutatására az 1.3. fejezetben kívánok kitérni.

A szántóföldi penészflóra fontos képviselői az *Alternaria* gombanemzetség tagjai. Az általuk termelt mikotoxinok száma meghaladja a harmincat. Fő toxintermelő az *Alternaria alternata*, amely a legismertebb alternariatoxinok mindegyikét termeli (alternariol, alternariol-monometiléter, altenuen, tenuazonsav). Ezek közül a tenuazonsav rendelkezik a legnagyobb toxicitással, ami keringési zavarok formájában nyilvánul meg. A kalászos gabonafélék közül elsősorban a kukorica *Fusarium moniliforme* faj csoport okozta fertőzése során keletkeznek az egyéb mikotoxinok csoportjába sorolható moniliformin és fumonizin B₁, B₂, B₃ (Chelkowski 1989).

Az *Aspergillus ochraceus* fő toxintermelő, gyakran előforduló szaprobionta penészgomba, mely már igen alacsony vízaktivitás érték mellett is szaporodik. A gomba által szintetizált ochratoxin A (klórtartalmú dihidrokumarinhoz kapcsolódó fenilalanin) erősen nefrotoxikus és hepatotoxikus, amit Európában, az USA és Kanada egyes területein humán vérvizsgálatok eredményei is alátámasztottak (Petzinger et al. 2000). Potenciális toxintermelők az *Aspergillus flavus* és az *Aspergillus parasiticus*, melyek szubsztituált kumarinszármazékokat szintetizálnak (aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂).

Élettani hatásukat állatokon testsúlycsökkenés, étvágytalanság és ezt követően gyors elhullás jellemzi. Az *Aspergillus* fajok (pl. *A. versicolor*, *A. nidulans*) tenyészeiből furanofurán-vázaz, szubsztituált xanton vegyületek, ún. szterigmatocisztinek izolálhatóak, melyeknek erőteljes májkárosító és tumorindukáló hatása van.

A *Penicillium*ok széles hőmérsékleti tartományban képesek szaporodni, nedvességigényük viszont magasabb (min. $a_w = 0,81$), mint az *Aspergillus* gombáké. A *Penicillium viridicatum* tenyészeiből izolálható a klórt nem tartalmazó ochratoxin B, mely az ochratoxin A-hoz hasonló élettani tüneteket produkál. A citrin (*Penicillium citrinum*) nefrotoxikus, elsősorban vesekárosodást, az öttagú laktonok közé sorolható patulin (*P. expansum*, *P. patulum*) pedig antibiotikus hatása ellenére a magasabbrendű élőlényeken vérzékenységet, valamint ödémaképződését indukál. A szeszkviterpén típusú, reakcióképes aldehid funkciós csoportot és két epoxid gyűrűt tartalmazó PR-toxin (*P. roqueforti*) erőteljes májkárosító hatásához vérzékenységi tünetek is társulnak.

1.2.2. *Fusarium* fajok általános jellemzése

A *Fusarium* genus felfedezése Link nevéhez fűződik (1809), míg a *Fusarium culmorum* fajt az 1890 években az USA területén kutatásait végző Arthur (1890) írta le. A későbbiekben több *Fusarium* fajról (*F. graminearum*, *F. avenaceum*, stb.) derült ki, hogy a búzanövény megbetegedését okozzák.

A hazai kutatások során 15 fajt izoláltak, melyek közül a *F. graminearum* és a *F. culmorum* fordul elő a legnagyobb gyakorisággal (Mesterházy 1984). Ezek taxonómiaiilag a *discolor* szekcióba sorolandó fajok (Nelson et al. 1983). A kísérletek során egyértelműen igazolódott, hogy a búzanövények esetében mintegy 90 %-ban a két *Fusarium* faj okozza a megbetegedéseket, melyek mellett a *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* is kimutatható volt. A kórokozók patogenitás vizsgálata során szintén a *F. graminearum* és a *F. culmorum* izolátumai mutatták a legnagyobb fertőzőképességet (Mesterházy 1977, 1981).

A rezisztencianemesítés során lényeges kérdés a fajok specializálódásának (rasszok kialakulása) lehetősége is. A nekrotróf kórokozóknál specializált rasszok ritkán fordulnak elő, de néhány kórokozó csoportban igen fontosak, pl. *F. oxysporum*. A *F. graminearum* és a *F. culmorum* estében rasszok kialakulásával nem kell számolnunk, amit számos, Európa különböző helyeiről származó izolátum tesztelése is bizonyít (Mesterházy 1995). Mindezek figyelembevételével a növénynemesítő munka fókuszába az egyes gombák okozta

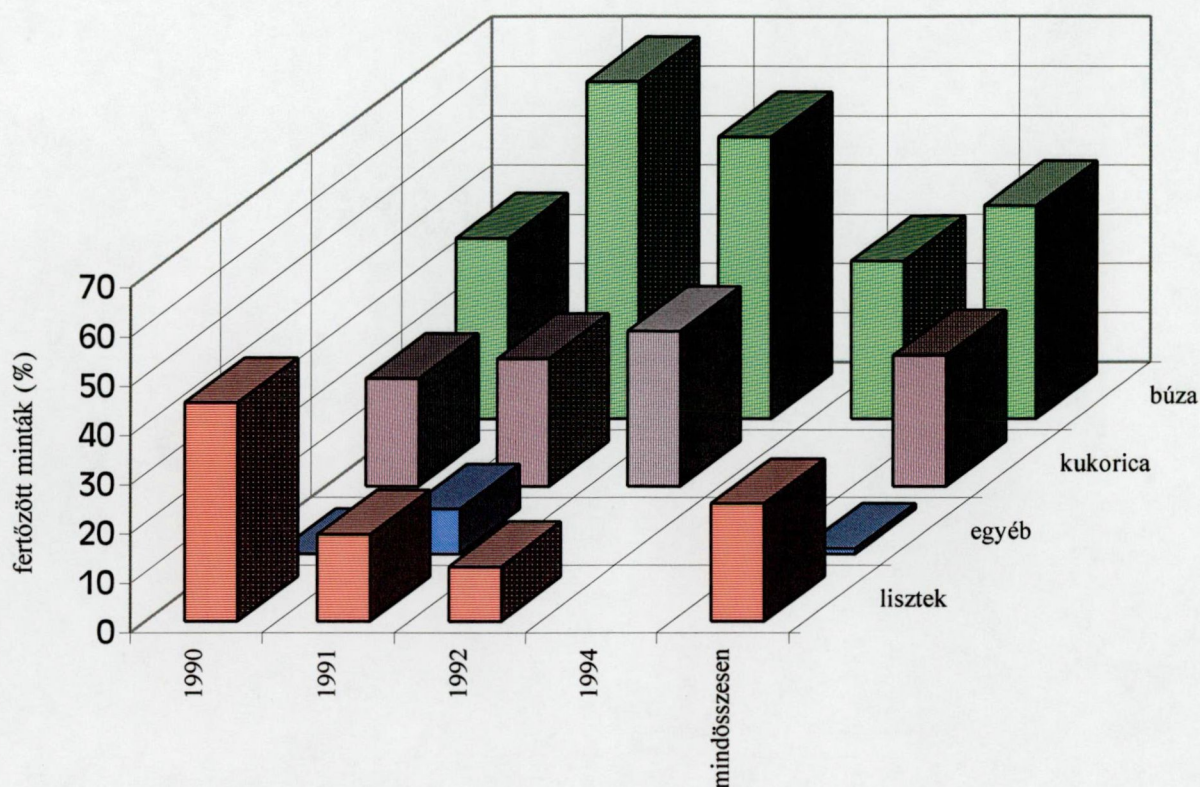
megbetegedések kiküszöbölésére irányuló rezisztencianemesítési eljárások kerültek, amihez természetesen társul a megfelelő vegyszeres védekezés, a korszerű agrotechnika és tárolástechnika is.

A *Fusariumok* által szintetizált mikotoxinok egészségkárosító hatása hazánkban is komoly közegészségügyi és állategészségügyi problémát vet fel, amit a Csongrád megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás regionális laboratóriumában végzett, különböző termékek DON tartalmának monitorozása során kapott eredmények (1990-1994, 1996-1998) is alátámasztanak. Az 1990-1994 időszakot tekintve, a *Fusariumok* okozta megbetegedések kialakulásának az időjárási viszonyok nem kedveztek, ennek ellenére a vizsgálatssorozatba bevont különböző cereáliák (341 db) 1,1 % - 68,2 % -a esetében a DON jelenlétét HPLC technikával igazolni tudtuk (2. táblázat, 3. ábra).

<i>Gabonafélék Fusarium fertőzöttségének alakulása a dél magyarországi régióban (1990-1994)</i>					
év	fertőzött minták (%)				
	búza	kukorica	egyéb	lisztek	mintaszám
1990	36,6	21,9	0	44,4	114
1991	68,2	25,9	9,1	17,6	94
1992	57,1	31,4	-	11,1	83
1994	32,0	-	-	-	50
mindösszesen	43,2	26,6	1,1	23,9	341

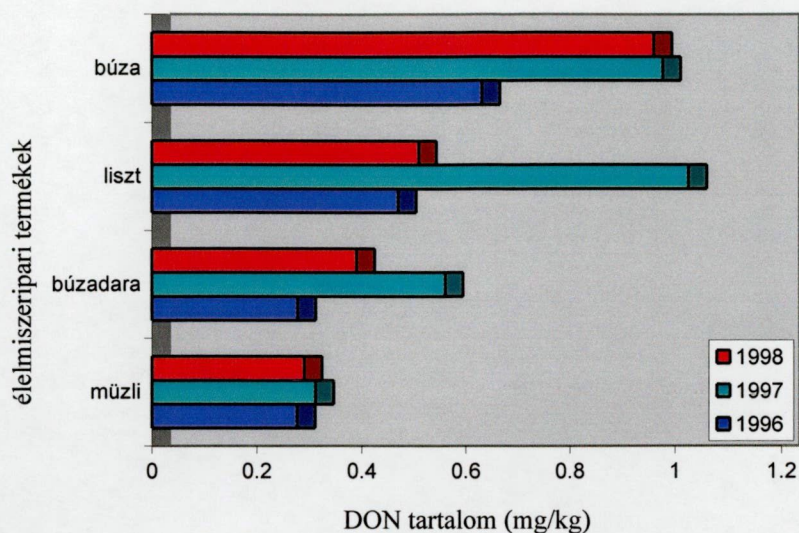
- : jelzett gabonaféle körvizsgálati mintái nem álltak rendelkezésünkre

2. táblázat. Egyes gabonafélék DON szennyezettsége



3. ábra. Gabonafélék *Fusarium* fertőzöttségének alakulása a dél magyarországi régióban (1990-1994)

Az 1997-1998 évben tapasztalt rendkívüli meleg és csapadékos időjárás következtében, a *Fusariumok* okozta megbetegedés rendkívül nagy termőterületeket érintett. A várakozásoknak megfelelően a keletkezett mikotoxinok szintje is lényegesen megemelkedett az 1995-1996 évi szinthez viszonyítva. A DON tartalom HPLC-vel történt kvantitatív meghatározása során kapott mérési eredmények a búza (kb. 1 mg/kg) és a lisztek (1-1,3 mg/kg) esetében a javasolt egészségügyi határértékeket (0,2-0,5 mg/kg) lényegesen meghaladó szintet tükröztek (4.ábra). A vizsgálatba bevont élelmiszeripari termékek közül a müzli mikotoxin kontaminációja az egészségügyi szempontból még elfogadható szintet mutatott (0,3 mg/kg), mely a müzliben található komponensek összetételi arányával magyarázható.



4. ábra. Néhány élelmiszeripari termék DON szennyezettsége

1.2.3. A *Fusarium* fajok növényegészségügyi jelentősége

1.2.3.1. A búza kalászfuzariózisa

A búzakaralászt és -szemet károsító szántóföldi kórokozók közül, ma Magyarországon a legnagyobb népgazdasági kárt a *Fusarium* fajok okozzák. Mellettük említést érdemel a *Septoria nodorum*, mely elsősorban a tenyészkertek egyes fogékony genotípusai esetében okoz kalász- és szemfertőzöttséget, ugyanakkor a köztermesztésben szerepe elhanyagolható. Nem elhanyagolható az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok által a helytelen raktározás során okozott penészesedés sem, ami súlyos minőségromlást eredményez (Mesterházy 1974a, Szunics et al. 1987).

A búza *Fusarium* fajok által előidézett megbetegedései több-kevesebb rendszerességgel lépnek fel. A betegség kifejezés használata azzal indokolható, hogy a növény különböző részei fertőződhetnek (gyökér, levelek, kalász) és a fertőzés a legkülönbözőbb fejlődési szakaszokban jelentkezhet egészen a csírázástól az érésig, sőt, vele, mint raktári penésszel is számolnunk kell. A károsodás mértéke függ a növény ellenállóképességétől, a környezeti tényezőktől, a kórokozó adottságaitól és nem utolsósorban az emberi beavatkozástól (Mesterházy 1977, Sheshthavi et al. 1974).

Az infekció eredményeképpen, a teljesen kifejlett szemeken a rózsaszín vagy fehéres penésztelepek szabad szemmel is észlelhetők (5. ábra/b), míg a kalász és levelek esetében a foltosodás, száradás vagy más külső elváltozás észlelhető (5. ábra/a).



5. ábra. *Fusarium* fertőzött búzakaralász (a) és búzaszem (b)

1.2.3.2. A gazdanövény szerepe a betegség kialakulásában

A *Fusarium* fajok okozta fertőzések eredményeképpen keletkező mikotoxinok jelenlétével és egészségkárosító hatásával nemcsak a komoly járványok esetében, hanem kisebb megbetegedések esetén is számolni kell, tehát a védekezés lehetőségeinek a megteremtése az elsődleges cél.

A betegség elleni leghatékonyabb védekezési forma az ellenálló növényfajták nemesítése. Az egyes publikációk szerint a tavaszi búzafajták között találhatóak kiváló ellenállóságú fajták (Nobeoka Bozu, Sumey-3, Wuhan 2, Wuhan 3, CNO79). Ezekre a fajtákra jellemző, hogy a mesterséges inokuláció nagyon enyhe tüneteket okoz, a kalászfertőzöttség mértéke

alig éri el a 3-4 %-ot, a termésveszteség ritkán szignifikáns, a szemfertőzöttség pedig 1% alatt marad, míg a legfogékonyabb fajták szemfertőzöttsége elérheti a 100 %-ot is (Mesterházy 1993). Az őszi búzafajtákkal végzett kísérletek azt bizonyították, hogy a hazai legellenállóbb genotípusok nem érték el a tavaszi fajták rezisztencia színvonalát. A Gabonatermesztési Kutató Kht adatai alapján azonban a Ringó Sztár, GK Kincső, Bu-20, Mv16 és GK Bence szántóföldi körülmények között is elfogadható ellenállóképességet produkált. A hazai helyzetelemzés alapján megállapítható, hogy a vetésterület nagyobb hányadán olyan fajták termesztése folyik, melyek adott körülmények között súlyosan fertőződhetnek. A helyzet rosszabbodott a GK Bence, GK Kincső és a Bu-20 köztermesztésből való kiszorulásával (minőségi okok), mert ez az átlagos rezisztenciaszint csökkenéséhez vezetett (Mesterházy 1986). A megoldás tehát a rezisztencia javításában rejlik. A rezisztencianemesítési program kiindulópontja az ellenállóság örökölhetősége. A kapcsolatos publikációk többnyire három domináns génről számolnak be, de az intermedier öröklődés is valószínűsíthető (Nakagawa et al. 1966, Parry et al. 1995). Ezen a területen fontos szerepet kap a tolerancia, mivel azonos ellenállóságú vagy fogékonyságú fajták között szignifikáns terméskülönbség van. A több éven keresztül folyó, szántóföldi kísérletek során a toleráns fajták egyértelműen nagyobb termés hozamot produkáltak. A termés továbbfeldolgozása szempontjából a toxinszennyezettség mértéke meghatározó, így a vizsgálatok fókuszába az ellenállóság és DON tartalom közötti kapcsolat került (Mesterházy et al. 1993).

A természetes fertőződést lényegesen befolyásolja a morfológiai tulajdonságok közül a növénymagasság, mely csökkenti, és a szálkasság, mely akár 100 % - kal is növelheti a fertőződés súlyosságát (Mesterházy 1990a). Meghatározó lehet a kalászok távolsága a zászlóslevél tövétől, mert minél hosszabb ez a szártag, annál kevésbé fertőződik a kalász (Parry 1993). További faktorok is jelentősen fokozhatják a búza szemfertőzöttségét, így az elterjedten jelentkező lisztharmat megjelenése kockázati tényezőnek számít (Mesterházy 1977).

1.2.3.3. Környezeti tényezők

Amennyiben a gazdanövény fogékony és a kórokozó is jelen van, a járvány kitörése a környezeti tényezőkön múlik. A környezeti tényezőket célszerű két csoportra bontani:

1./ időjárási feltételek

2./ agrotechnikai eljárások (vetésforgó, vegyszeres védekezés, raktározás)

1./ Szántóföldi kísérletek adatai alapján a *F. graminearum* okozta fertőzéshez kb. 25 °C, míg a *F. culmorum* esetében néhány fokkal alacsonyabb hőmérséklet szükséges. Fontos megjegyezni, hogy az éjszakai hőmérséklet sem eshet 15-18 °C alá. A páratartalom tekintetében legalább 20 órán keresztül 100 %-os páratartalom (min. 5 mm napi eső) szükséges a fertőzés kialakulásához, ezért érthető, hogy elsősorban a virágzás körüli, meleg, csapadékos vegetációs időszakokban alakulnak ki a nagyobb járványok (Scott 1988).

2./ A növénynemesítés elsődleges célja a ma még köztermesztésbe kerülő, fogékony fajtaszortiment felváltása rezisztens fajtákkal, ezután a szükséges agrotechnikai eljárások kidolgozása következik. Természetesen az ellenálló növényfajták megjelenésével az agrotechnika szerepe csökken, de nem elhanyagolható. Az agrotechnikai hibák jelentős termés-csökkenéssel járhatnak, ezért hatásuk sorsdöntő lehet. A fontosabb agrotechnikai védekezési lehetőségek:

- az előveteményből származó növény maradványok (kukoricaszár, gabonaszalma, pillangósszalma) eltávolítása a tábláról vagy alászántása
- a túl sűrű növényállomány elkerülése érdekében optimális vetőmagnorma és kiegyenlített műtrágyázás
- a fertőzés valószínűségét növelő, dőlésre hajlamos fajták kizárása a termesztésből
- időbeni aratás
- kíméletes cséplés

A raktározás körülményei lényegesen ronthatják a minőséget, illetve növelhetik a toxintartalmat. A helyes raktározási körülmények az alábbi szempontok szerint érhetők el, amennyiben a szántóföldön egészséges, 12-14 %-os nedvességtartalmú termény betakarítása történt meg:

- a termények életműködésével összefüggő hőtermelés miatt a silókban tárolt takarmányok hőmérsékletét és nedvességét ellenőrizni kell, megelőzésként szellőztetést, szükség esetén átforgatást kell végezni,
- a helytelen tárolás során megjelenő penészgombák életműködéséhez nélkülözhetetlen oxigén elvonásával (szigetelt silók) a minőségromlás veszélye csökkenthető,

- a megfelelő nedvességtartalom elérése érdekében a szárítás művelete is előtérbe kerülhet, de a magas energiaárak mellett ezzel a lehetőséggel ritkán élnek,
- az idegen anyagok, törött szemek, pelyvamaradványok eltávolítása javítja a légáramlást, ezáltal csökkenti az ún. öngyulladás veszélyét is.

1.2.3.4. A vegyszeres védekezés lehetőségei

A gabonafélék szántóföldi eredetű gombabetegségeinek kiküszöbölése céljából különböző kémiai hatóanyagokat tartalmazó fungicidek állnak rendelkezésre. A jó hatásfokkal működő fungicidek költségigénye rendkívül nagy, de amíg a megfelelő rezisztenciával rendelkező fajtastruktúra nem alakul ki, a vegyszeres védekezésre szükség lesz.

Az 1992-1995 között végzett hazai helyzetfelmérés során különböző fungicidek hatását tesztelték a *Fusarium* fajok okozta kalászfertőzöttség (*Fusarium* head blight, FHB) mértékének alakulására. A kísérletek során különböző rezisztenciájú búzafajtákat (GK Bence, GK Zugoly, GK Zombor, GK Csaba) fertőztek eltérő patogenitású *F. graminearum* és *F. culmorum* izolátumokkal, majd hatóanyagukban eltérő fungicidekkel próbálták a betegséget mérsékelni. A Bayer cég által forgalmazott Folicur 250 EC, Folicur BT, Falcon, Caramba, karbendazim és propikonazol 250 EC tesztelésekor a tebukonazol tartalmú fungicidek bizonyultak a leghatásosabbnak, a Caramba szintén kiemelhető, a többi hatása mérsékelt volt. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a gombaölőszerek hatékonysága függ a gabonafajta ellenállóképességétől - hiszen a szenzitív fajtákat még a leghatékonyabb fungicidek sem képesek teljesen megvédeni - valamint az izolátumok életképességétől is (Mesterházy et al. 1996, Caron 1995, Daugenet et al. 1991). A fungicidek hatóanyag összetételének megválasztásakor fő szempont a különböző kórokozókkal szembeni együttes hatékony védelem, melynek előfeltétele az *in vivo* tesztelés.

A triazol típusú hatóanyagot tartalmazó fungicidek biokémiai hatásmechanizmusát tekintve a szterol szintézis gátlása figyelhető meg (delta 8 - delta 7 izomeráz enzim), tehát a gombaölőszerek hatásosságát a szterol profil meghatározásával jellemezni tudjuk (Tiemann et al. 1997).

1.3. A *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok

A *Fusarium* gombák nagy része rendelkezik toxintermelő képességgel (3. táblázat). Számos publikációban találhatunk utalást arra vonatkozóan, hogy egyes *Fusarium* fajok

különböző kémiai szerkezetű mikotoxinokat szintetizálnak, melyek közül toxikológiai szempontból kiemelkedők a trichotecének (jelenleg 48 ismert metabolit), a zearalenon, zearalenol és a fumonizinek. A fertőzött takarmányok (pl. búza, kukorica) esetében több toxin párhuzamos jelenlétével is számolnunk kell, ami fogyasztás esetén természetesen a magasabbrendűekre gyakorolt, kevert élettani tünetek formájában nyilvánul meg.

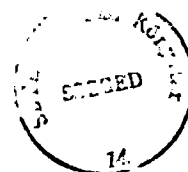
<i>Gombafaj</i>	<i>Termelt mikotoxinok</i>
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	T-2, HT-2, diacetoxiscirpenol, butenolid
<i>Fusarium poae</i>	NIV, HT-2, diacetoxiszcirpenol
<i>Fusarium semitectum</i>	beauvericin
<i>Fusarium graminearum</i>	ZEA, NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON
<i>Fusarium culmorum</i>	NIV, DON, 3-AcDON, ZEA
<i>Fusarium moniliforme</i>	fumonizin B ₁ , B ₂ , moniliformin, ZEA
<i>Fusarium oxysporum</i>	fusarenon-X (F-X), moniliformin, ZEA
<i>Fusarium crookwellense</i>	NIV, F-X, ZEA
<i>Fusarium tricinctum</i>	moniliformin

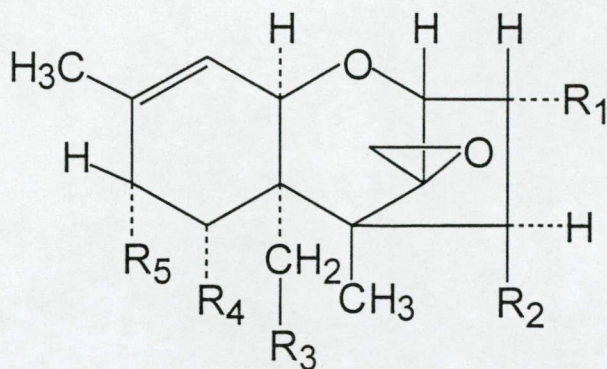
3. táblázat: Néhány *Fusarium* faj toxinprofilja (Nelson et al. 1981)

1.3.1. Epoxitrichotecének

A trichotecének bioszintézisének háttérét tekintve maga az alapváz, amely még nem toxikus tulajdonságú, a koenzim-A-ból származtatható lipidek szintézisútján keletkezik. A trichotecének kémiai szerkezetüket tekintve szeszkviterpén típusú vegyületek, tetraciklusos 12,13-epoxitrichotecén-9 származékok, melyeknek a 3,4,7,8,15 C-atomján különböző funkciós csoportok foglalnak helyet.

Kémiai szerkezetük alapján egyszerű és makrociklikus trichotecéneket különböztethetünk meg. A kutatómunkám szempontjából fontos és az egyszerű trichotecének csoportjába sorolandó A és B típusú trichotecének és szerkezeti képletük a 6.ábrán látható.





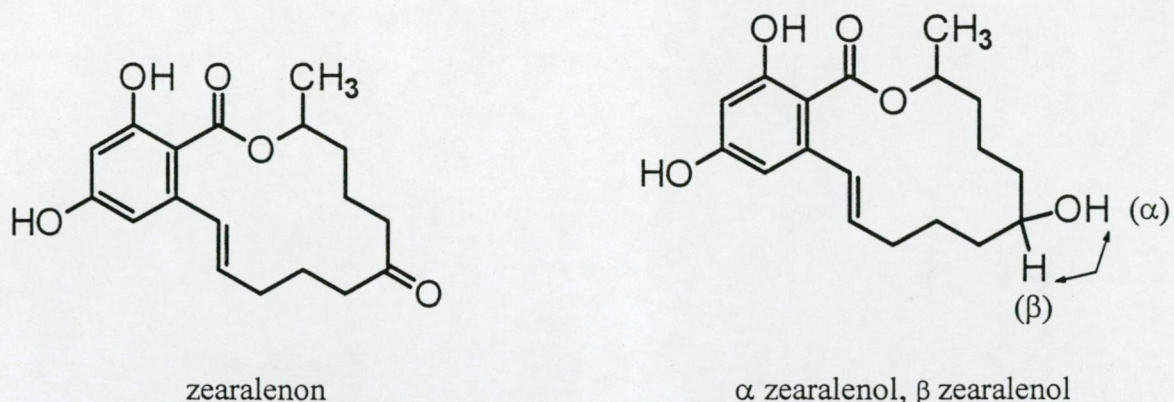
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>A</u> típus	T-2 toxin	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	HT-2 toxin	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	diacetoxiszcirpenol (DAS)	OH	OAc	OAc	H	H
	neoszolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH
<u>B</u> típus	4-acetilnivalenol (4-ANIV)	OH	OAc	OH	OH	=O
	nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	=O
	4-dezoxinivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
	3-acetil-dezoxinivalenol (3-AcDON)	OCOCH ₃	H	OH	OH	=O
	15-acetil-dezoxinivalenol (15-AcDON)	OH	H	OCOCH ₃	OH	=O

6. ábra. A legfontosabb tetraciklikus trichotecén mikotoxinok szerkezeti képlete

1.3.2. Zearalenon, α , β zearalenol

A *Fusarium*-mal fertőzött gabonafélék közül a kukorica etetése esetében leggyakrabban előforduló ösztrogén szindróma kialakulásáért a zearalenon és a zearalenol (7. ábra) felelős.

Az egyéb mikotoxinok közé sorolható zearalenon és zearalenol kémiai szerkezetét tekintve rezorcilsav-laktonok és a poliketidek közé tartozik. A zearalenol a hidroxiszteroid hidrogenáz (HSD) által katalizált reakció végterméke (Kießling 1988).



7. ábra: A zearalenon és az α , β zearalenol szerkezeti képlete

1.4. A *Fusarium* fajok által szintetizált mikotoxinok műszeres analitikai vizsgálatának módszerei

1.4.1. Az analitikai eljárások alapelvei

A mikotoxinok kvalitatív és kvantitatív analízisére számos lehetőség áll rendelkezésre (4. táblázat). Előfeltétel azonban a mintamátrixban található mérendő komponensek megfelelő oldószerrel/oldószerkeleggyel (pl. acetonitril-víz, kloroform-etanol, kloroform) történő extrakciója, az extraktumok tisztítása ill. koncentrálása. Az extrakciót megelőzően a mintaelőkészítésnek (tárolás, aprítás, homogenizálás, mintavétel) igazodnia kell a Jó Laboratóriumi Gyakorlat (Good Laboratory Practice, GLP) alapelveihez.

A vizsgálati anyagok extrakciója során leggyakrabban a konvektív hőközlést alkalmazzák, ugyanakkor a mikrohullámú feltárással az extrakció ideje lényegesen csökkenthető (2-3 perc). Az extrakcióval szembeni alapkövetelmény a nagy hatásfokú kinyerés, ami nehézségekbe ütközhet, mivel a mikotoxinok esetében használatos multitoxin módszereknél az erősen poláris komponensek (moniliformin, nivalenol) mellett az apolárisabb karakterű toxinok (T-2, zearalenon) egymás melletti elválasztása és detektálása a cél. Az analitikusok körében elterjedt az ún. „spiked” minták előzetes kinyerési vizsgálata, melynek eredményeit (80-100 %-os visszanyerés) fenntartással kell kezelnünk, mivel a természetesen szennyeződött minták esetében ez az érték akár 50 %-osra is csökkenhet (Trenholm et al. 1985).

Az extrakció eredményeképpen az extraktum számos, a kimutatást zavaró anyagot (lipidek, pigmentek stb.) tartalmazhat, ezért további tisztítási műveletekre lehet szükség. A cereáliákban felelhető mikotoxinok közül a NIV és DON meghatározása kis koncentrációjuk és nem egyenletes eloszlásuk miatt nehézkes, ezért szilárd-fázisú extrakció (SPE) alkalmazásával a mintatisztítás sokkal hatékonyabbá tehető. Az SPE oszlopokat tekintve az neutrális alumínium oxid-aktív szén, Celite és aktív szén keveréke, szilika és gyakran C18 töltet segítségével a mintamátrixban található, kimutatást zavaró komponensek gyorsan és hatékonyan eltávolíthatóak. A visszanyerés 84-94 % -os, a kimutathatósági határ pedig NIV tekintetében 0,015 µg/g, DON estében pedig 0,05 µg/g volt (Lauren et al. 1987, Romer 1986).

TLC elválasztások esetén jó hatásfokot érhetünk el a folyadék-folyadék extrakcióval. Elterjedten alkalmazzák a keverék adszorbenseken (aktív szén, neutrális alumínium oxid) keresztül poláris eluenssel történő eluálást, ami a műszeres vizsgálatok követelményeinek is megfelelő tisztaságot eredményez. Az SPE extrakció céljára számos normál, reverz fázisú illetve ioncserélő töltetet tartalmazó oszlop áll rendelkezésre, melyekkel a kívánt visszanyerés elérhető. Az SPE automatizálása is megoldott, ami lehetővé teszi a sorozatvizsgálatok gyors és egyszerű kivitelezését, viszonylag kis oldószermennyiség felhasználásával (Rood et al. 1988b).

<i>Kimutatás alapelve</i>	<i>Módszerek</i>
Elválasztástechnika	vékonyrétegkromatográfia (TLC)
	nagyhatékonyságú vékonyrétegkromatográfia (HPTLC)
	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)
	gázkromatográfia (GC)
	kapilláris elektroforézis (CE)
	kapcsolt technikák (HPLC/MS, GC/MS)
Immunkémia	radio-immun-meghatározás (RIA)
	enzimhez kötött immun-szorbens analízis (ELISA)

4. táblázat. Mikotoxinok legelterjedtebben alkalmazott vizsgálati módszerei

1.4.2 Elválasztástechnikai módszerek

1.4.2.1. Vékonyrétegekromatográfia (TLC)

A *Fusariumok* által szintetizált mikotoxinok analitikájában alkalmazott módszerek közül a vékonyrétegekromatográfias (TLC) eljárások már a 80-as évektől elfogadottak, melyeknél a normál és fordított fázisok egyaránt használatosak voltak (Romer 1986, Kamimura et al. 1981). A TLC vizsgálatok előnye a viszonylag csekély anyagi ráfordításon kívül az, hogy a toxinok saját fluoreszcenciája mellett szelektív kémiai előhívó szerek alkalmazásával a jellemző csoportanalízis is elvégezhető (Abbas et al. 1988, Abouzied et al. 1991). Az eljárás jelentőségét növeli az a tény is, hogy jelenleg a különböző takarmányfélék és élelmiszerek esetében (pl. lisztek, étkezési gabona, korpa, müzli), több mikotoxin (DON: AOAC 986.17, ZEA: AOAC 976.22) tekintetében a döntő vizsgálati módszer a vékonyrétegekromatográfia.

Romer (1986) a trichotecén-vázak mikotoxinok TLC-kimutatására a Kamimura által a B-típusú trichotecének detektálására ajánlott, erősen szelektív alumínium-klorid (AlCl_3) reagenst alkalmazta és UV fényben intenzív kék színt ért el. Az A típusú trichotecének, melyek apolárisabbak a B típusú trichotecénekénél, valamint gyengén adszorbeálódnak a lemez felületére, toluol / acetonitril szelektív oldószer rendszerrel jól elválaszthatók.

Baxter és mtsai (1983) a B típusú trichotecének esetében általánosan felhasznált reagensek körét (H_2SO_4 , AlCl_3 , p-ánizsaldehid) az A típusú trichotecének detektálását elősegítő kromogén reagensekkel 4-(p-nitrobenzil) piridin (NBP), nikotinamid-2-acetilpiridin (N-A) egészítették ki.

Takitani és mtsai (1979) és Sano (1982) olyan TLC módszerről számolt be, melynél a mikotoxinokat a 12,13 epoxi csoportra nézve specifikus 4-(p-nitrobenzil) piridin-tetraetilén-pentamin (NBP-TEPA) reagenssel hívták elő.

1.4.2.2. Gázkromatográfia (GC)

A kutatók egy része az automatizálhatóság, a nagyobb érzékenység ill. a hatékonyabb elválasztás (különösen kapilláris GC esetében) miatt a gázkromatográfias módszereket helyezte előtérbe. Az 1980-as években jelentek meg az első gázkromatográfias publikációk, melyek metodikai alapját az adta, hogy a toxinok alkoholos-OH csoportját ill. csoportjait származékképezve a molekula illékonyá tehető, azaz gázkromatografálható (Scott 1982). Rutin vizsgálati célokra, töltött oszlopok

használata esetén elfogadott detektálási módszerek az elektron befogásos (ECD) és a lángionizációs (FID) eljárások. A trichotecén mikotoxinok megbízható kimutatására általánossá vált a kapilláris GC módszer ECD és FID detektálási változata, mely nagyobb felbontóképességgel rendelkezik. (Scott 1991, Ware et al. 1986). A származékképzett mintát leggyakrabban ún. „split” ill. „splitless” injektor segítségével juttatják az elválasztást végző kromatográfiás GC oszlopra. A mikotoxin kontamináció elfogadható szintjét rögzítő ajánlott és kötelező előírásokat szemelőtt tartva a kimutathatósági határ rendkívül kicsi (mg/kg, µg/kg) ezért az analitikusok a kapilláris oszlopra történő direkt mintabevitelt, az ún. „on-column” injektálási módszert tartják célravezetőnek, melynek során az összes injektált mintamennyiség a kromatográfiás oszlopra kerül. Ez az injektálási eljárás azonban igen „tisztá” mintát igényel, ami általában csak többlépéses extrakcióval érhető el.

A trichotecének származékképzésének két legelfogadottabb módja a szililezés illetve az acilezés. A származékképzés céljára számos szililező [N,O-bis trimetilszilil-trifluoracetamid (BSTFA), trimetilszililimidazol (TMSI), trimetilklórszilán (TMCS), hexametildiszilazán (HMDS)] és acilező [heptafluorvajsav anhidrid (HFBAA), heptafluorvajsav (HFB), heptafluorbutirilimidazol (HFBI)] szert alkalmaznak (Ikediobi et al. 1971, Swanson et al. 1982, Croteau et al. 1994, Rizzo et al. 1986).

1.4.2.3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A nagyműszeres technikák közül a HPLC eljárás alkalmazható mind az A és B típusú trichotecének, mind a zearalenon és származékainak mintaelegekből történő elválasztására. A publikációk többségében fordított fázisú (C8, C18) oszlopot, metanol / víz vagy acetonitril / víz oldószer elegyeket használnak izokratikus vagy grádiens elúcióval kombinálva.

A mikroszkopikus gombafajok azonosításában a kemotaxonómiai index rendkívül nagy segítséget jelent. A másodlagos metabolit profil felvétele során különböző oldószerelegyeket tesztelve, C18 fordított fázisú kromatográfiás oszlopon, 0,05 % trifluorecetsav tartalmú acetonitril / víz grádiens elúció bizonyult a legmegfelelőbbnek. A detektálás fix hullámhosszon (254 nm) történt, ugyanakkor a 200 és 220 nm végzett monitorozás az A és B típusú trichotecének egyidejű azonosítását is lehetővé tette. A mérési sorozat eredményeképpen 182 fontos gombametabolit retenciós indexét publikálták (Frisvad et al. 1987, Gerlach et al. 1982).

Schmidt és mtsai (1981) fertőzött rizsszemekből az A típusú trichotecéneket (T-2, HT-2 és DAS) acetonitril / víz oldószerkeleggyel történő extrahálást követően fordított fázisú kromatográfiás oszlopon (C18) metanol / víz grádiens alkalmazásával választották el. A detektáláshoz - mivel ezen komponensek UV abszorpciója rendkívül alacsony - differenciál refraktométert alkalmaztak.

A B típusú trichotecének (NIV, DON) gabonamintákból történő kimutatására Lauren et al. (1991) C18 oszlopot és metanol / víz (14/86 v/v) elegyet alkalmazott az izokratikus elválasztás során. A komponenseket UV detektorral 222 nm-es hullámhosszon detektálták. Szécsi és Bartók (1995) a Magyarországon előforduló *F. graminearum* izolátumok trichotecén kemotípusainak meghatározása során az A és B típusú trichotecéneket és a zearalenont C18-as oszlopon választotta el háromcsatornás grádiens elúciót [víz / acetonitril - víz (80/20, v/v) / acetonitril] alkalmazva. A detektálás diódasoros UV detektorral (A típusú trichotecének 200 nm, B típusú trichotecének 220 nm, zearalenon 236 nm) történt.

A nagyobb érzékenység elérése érdekében az ún. oszlop előtti (pre-column) és oszlop utáni (post-column) származékképzési módszerek is elterjedtek. A T-2 és HT-2 mikotoxinok oszlop előtti származékképzését Cohen et al. (1992) kumarin-3-karbonil kloriddal valósította meg. A származékokat C18-as oszlopon, mozgófázisként 0,75 % ecetsav-tartalmú acetonitril / víz oldószerkeleggyet alkalmazva választotta el. A detektálás fluoreszcenciás detektorral 292 nm-es gerjesztési és 425 nm-es emissziós hullámhosszakon történt. A B típusú trichotecének közül a DON fluorimetriás detektálásának előfeltétele a bepárolt mintaextrakt oszlop előtti derivatizációja cirkonil-nitrát és etiléndiamin metanolos oldatával (Malone et al. 1998). A zearalenon megfelelő hullámhosszon történt gerjesztés után származékképzés nélkül is fluoreszkál, azonban a fluoreszcens jel nagysága jelentősen fokozható oszlop utáni származékképzéssel. Ebben az elrendezésben az oszlopról eluálódó komponensek egy ún. T összekötőn keresztül külön pumpával bevezetett 0,25 M alumínium-klorid reagenssel keverednek egy 50-60 C°-ra fűtött teflon spirálban. Amíg a reakcióelegy áthalad ezen az 500 cm hosszúságú és 0,3 mm belső átmérőjű kapillárison, megtörténik a reakció és a reakciótermék 285 nm-en történő gerjesztés mellett 440 nm emissziós hullámhosszon detektálható (Hetmanski et al. 1991).

1.4.2.4. Kapilláris elektroforézis (CE)

A nyolcvanas évek elején az elválasztástechnika egy új, rendkívül hatékony és érzékeny eljárással, a kapilláris elektroforézissel (CE) bővült. A módszert először Jorgenson és Lukács az aminosavak elválasztásával kapcsolatban publikálta. A CE kutatás azonban csak 1988-tól kezdődően gyorsult fel amikor megjelent az első kereskedelmi forgalomban is kapható készülék. Azóta elsősorban a biopolimerek elválasztástechnikájában vált a vezető módszerré. Ez az eljárás több módszer előnyeit ötvözi. A nagy hatékonyságú elválasztást biztosító ömlesztett kvarc kapillárist (belső átmérője kisebb mint 75 μm) a kapilláris gázkromatográfiától, míg a töltéssel rendelkező komponensek migrációjáért felelős elektromos erőteret a gélelektroforézistől kapta ez az eljárás. Sőt, ha figyelembe vesszük, hogy ezek a kvarc kapillárisok a hagyományos gélek (kapilláris gélelektroforézis) mellett megtölthetők már a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában bevált kis szemcseméretű szilikagéllel (kapilláris elektrochromatográfia) is, akkor a kapilláris elektroforézisben három eljárás (elektroforézis, GC, HPLC) egy-egy jelentős előnyét együttesen használhatjuk ki. Meg kell említeni, hogy a kapilláris elektroforézis ma már - a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) kifejlesztésének köszönhetően - nem csak töltéssel rendelkező, hanem neutrális komponensek vizsgálatára is alkalmassá vált. A CE eljárás óriási előnye a nagy felbontóképessége mellett az igen nagy érzékenysége és ezzel összefüggésben a kis mintaigény (rendszerint 50 nl alatti). A kapilláris elektroforézisben négy detektálási eljárás terjedt el (UV-látható, fluoreszcenciás, elektrokémiai, tömegspektrometriás), közülük az igen nagy érzékenysége, szelektivitása ill. a szerkezeti információk nyújtásának lehetőségei miatt a tömegspektrometriás kapcsolt eljárásnak (CE-MS) az elterjedése várható. Meg kell említeni a CE eljárással kapcsolatban a miniaturizálás trendjét, amely szerint a minta és a puffer adagolását, továbbá elektroforézissel történő elválasztását és detektálását néhány négyzetcentiméter felületű üveg, kvarc, műanyag ill. szilikon lapkákon, ún. mikrochip-en végzik. Fontos megemlíteni, hogy a mikotoxinok esetén mindössze az ochratoxin A-val kapcsolatban jelent meg olyan közlemény amely a kapilláris elektroforézist alkalmazta a komponens mintamátrixból történő elválasztására (Corneli and Maragos 1998, Böhs et al. 1995), azaz feltehetően a közeljövőben további publikációk fognak megjelenni a mikotoxinok CE meghatározásával kapcsolatban.

1.4.2.5. Tömegspektrometriás detektálással kapcsolt elválasztástechnikai módszerek (GC/MS, HPLC/MS)

A tömegspektrometria, mely már az 1920-as években ismert volt, rendkívüli érzékenysége, szelektivitása, sokoldalúsága, valamint szerkezetazonosítási képességei miatt a kutatólaboratóriumok nélkülözhetetlen módszerévé vált. Az elmúlt évtizedben jelentős fejlődésen mentek keresztül a tömegspektrometriával kombinált elválasztástechnikai eljárások. A tömegspektrometriás detektálás érzékenysége eléri, sőt némely esetben meg is haladja az igen érzékeny fluoreszcenciás ill. elektronbefogásos detektorokét. Ezen túlmenően az igen nagyfokú szelektivitás is jellemzi (különösen tandem tömegspektrométerek esetében) ezt a detektálási módszert. A detektálási szelektivitásra azért van szükség, mert a hagyományos detektálási módszereket alkalmazva [HPLC/UV, fluoreszcenciás (FL), refraktometriás (RI), GC hővezetőképességi (TCD), lángionizációs (FID), elektron-befogásos (ECD)] számos esetben egy kromatográfiás csúcsban több komponens is található, ami a pontos kvalitatív és kvantitatív meghatározást megnehezíti vagy lehetetlenné teszi. A GC ill. HPLC oszlopról eluálódott komponensek a tömegspektrométer megfelelő ionforrásában [elektron ütköztetési (EI), kémiai ionizáció (CI), atmoszférikus nyomású elektroporlasztási (API-ES) és atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI), vagy mátrixszal elősegített lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI)] után jutnak a tömegspektrométer analízátor [mágneses, quadropól, repülési idő (TOF), ioncsapda] terébe, amelyen keresztül haladva a detektor a molekula ill. fragmens ionokat tömeg/töltés (m/z) szerint detektálja. A detektálás során vagy az ún. kiválasztott ion figyelési módot (selected ion monitoring, SIM) vagy a pásztázó (SCAN) ion figyelési módot alkalmazzák (Becker et al. 1998). Az előbbire jellemző a rendkívüli érzékenység (pikogramm-femtogramm) és megfelelő ion/ionok kiválasztása esetén igen nagy szelektivitás, az utóbbira pedig a spektrumkönyvtári azonosítás lehetősége.

Soo et al. (1987), Tanaka et al. (2000) a trichotecéneket (NIV, DON) és a zearalenont az előzetes származékképzést (szililezés) követően GC/MS eljárással, elektron ütköztetési ionizáció (EI, 20 eV) felhasználásával határozták meg. A szelektív ion figyelési módban (SIM) a következő tömegeket detektálták: NIV: m/z 510, 379, DON: m/z 512, 422, ZEA: m/z 462.

A HPLC elválasztás során kapott eredmények konfirmálása (csúcs tisztaság) lehetséges GC- FID, ECD ill. MS csatolt technikával, származékképzést követően (Gleissenthal et al. 1989, Glenn et al. 1990).

Az afrikai régióban a kukorica *Fusariumok* okozta megbetegedése következtében szintetizálódó mikotoxinok közül a DON és ZEA szemterményből történő metanolos extrakcióját és származékképzését (trimetil-szilil, TMS) követően GC-MS technikával, szelektív ion figyelési módban határozták meg (Marasas et al. 1979).

A NIV és DON kvantitatív meghatározása történhet HPLC-APCI-MS technikával. A kétlépéses, rendkívül hatékony mintatisztítási lépést követően (Mycosep SPE oszlop) a mintakomponenseket víz / acetonitril / metanol (82/9/9, v/v) eluens alkalmazásával választották el, majd negatív APCI módszerrel ionizálták és a képződött deprotonált molekula iont (M-H) és a fő fragmens ionokat SIM módban detektálták (Razzazi-Fazeli et al. 1999).

1.4.3. Immunkémiai módszerek

A mikotoxinok meghatározására szolgáló vizsgálati módszerek kivitelezése során a következő problémákkal találkozhatunk:

- a toxinok amikor nyomnyi mennyiségben fordulnak elő a komplex mátrixokban, az analízis előtt bonyolult mintatisztítási műveleteket kell elvégezni.
- a mikotoxinok egyenlőtlenül oszlanak el a mezőgazdasági termékekben. A statisztikai variancia csökkentéséhez nagyszámú minta vizsgálatára van szükség.

A mikotoxinok meghatározására szolgáló új immunkémiai módszerek kidolgozásánál (RIA, ELISA) a felsorolt fő problémák megoldására törekedtek e mellett biztosítva a specifikusságot és az érzékenységet. Kihasználva az antitest mikotoxinra mutatott nagy specifitását, a nagyműszeres toxin meghatározásokhoz is nagy segítséget nyújtanak az immunkémiai módszerek. Bonyolult mintamátrixok esetében (pl. pörköltkávé, olajosmagvak) az SPE extrakció hatékonysága nem elegendő, ezért a már ELISA-ra kifejlesztett antitesteket oszlopon immobilizálják (pl. Sepharose gél) így az oszlopon átjuttatott (pl. vákuum) extraktumból csak a kívánt mikotoxin kötődik meg, a zavaró komponensek pedig az eluátummal távoznak. A következő lépésben az oszlopról a toxin szinte tisztán eluálható, és közvetlenül alkalmas a nagyműszeres mérésre. Az SPE oszlopokhoz kialakított automata rendszerek, így az immun-affinitás kromatográfiához (IA) is felhasználhatóak. A monoklonális antitestek alkalmazásával a módszer jó visszanyerést és folyamatosan jó minőséget biztosít (Kaveri et al. 1987). Több antitest egymás melletti alkalmazásával kémiai rokon mikotoxinok (pl. aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂,

teljes aflatoxin koncentráció) szimultán meghatározhatók (Li et al. 2000). Az IA oszlopok terhelhetősége jó, így nyomnyi mikotoxin szennyezettségek (pl. tejből aflatoxin M, ivóvízből összes aflatoxin, kávéitalból ochratoxin) vizsgálatára is alkalmasak.

1.4.3.1 Radio-immun-meghatározás (RIA)

A RIA hasznosítja az antigén-antitest reakció rendkívül nagy specifitását és az izotóp méréstechnika nagy érzékenységét. A RIA módszer lényege, hogy foszfát-pufferben oldott ismeretlen toxintartalmú mintát, valamint ismert mennyiségű sztenderdeket egyidejűleg inkubálunk állandó mennyiségű jelzett (pl. jód) toxinnal és specifikus antitesttel. Az antitesthez kötött és szabad toxin ammónium-szulfáttal - az egyik legegyszerűbb technika, mely jól alkalmazható a T-2 toxin meghatározására - illetve a legáltalánosabban használt dextránnal borított aktív szén oszlopon - mely sikeresen adaptálható a zearalenon és az aflatoxinok esetében is- történő elválasztását követően mérjük a radioaktivitást mindkét frakcióban. A kötött és szabad frakcióban mért radioaktivitás arányát a jelzetlen sztenderd toxin \log_{10} koncentrációjának függvényében grafikonon ábrázoljuk. A minta toxin koncentrációját a kalibrációs görbe segítségével számoljuk ki.

A RIA módszer érzékenységét tekintve az élelmiszer és takarmány mintákban a kimutatási határ 2-5 $\mu\text{g/kg}$, 60-100 % visszanyerés esetén. A módszer érzékenysége növelhető (1-2,5 $\mu\text{g/kg}$), ha extrahálást követően SPE mintatisztítási műveletet - pl. SEP-PAK oszlop- is elvégzünk. A poláris mikotoxinoknál a fordított fázisú SEP-PAK C-18, a nem poláris mikotoxinoknál pedig szilikagél alkalmazása a célravezető (Chu 1984).

1.4.3.2. Enzimhez kötött immun-szorbens analízis (ELISA)

A biológia anyagok meghatározására az ELISA módszernek két változata is használatos, az ún. homogén és a heterogén ELISA. A homogén ELISA eljárás során, az enzimaktivitás változik, miután a specifikus antitesthez való kötődés létrejött, így nem szükséges szétválasztani az enzim-ligand konjugát kötött és szabad formáját. A heterogén ELISA vizsgálatok esetében az enzimaktivitás változatlan marad, ami a kötött és a szabad enzim-ligand szétválasztását teszi szükségessé.

Az immunkémiai meghatározás során a specifikus antitestet először egy szilárd fázisra, pl. mikrolemez, polisztirol cső, viszik fel, amihez a glutáraldehides és a bikarbonátos módszer a legmegfelelőbb. A pufferrel átmosott lemezre felvitt mintaextraktot és a sztenderd toxint

általában egyidejűleg inkubálják az enzim-konjugátummal (valamennyi esetben a tormaperoxidáz az alkalmazott enzim), így a toxin és a jelölt toxin egyaránt versenyez az ismert mennyiségű antitest szabad kötőhelyeiért (kompetitív ELISA). A lemez mosását követően a kötött enzim aktivitás mennyiségi meghatározása ureát és oxidálható kromogént - pl. o-toluidin, tetrametilbenzidin (TMB) 5-amino-szalicilsav, 2,2''-azino-di-3-etil-benzotiazolin-6-szulfonát (ABTS) - tartalmazó szubsztrát oldattal történik. Az inkubálást követően az enzimreakciót általában kénsav hozzáadásával állítják le és a kialakult színt spektrofotometriás elven (extinkció) vagy sztenderddel való összehasonlítás révén mérik (Abouzied et al. 1991).

Az ELISA módszer érzékenysége 10-50-szer nagyobb, mint a RIA módszeré és nem kell radioaktív vegyületekkel dolgozni. A gabonaminták és ipari keveréktakarmányok vizsgálatára szolgáló TOXIKLÓN reagenskészlet (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutató Központ, Gödöllő) lehetőséget nyújt az ZEA, T-2, fumonizin toxinok gyors, egyszerű és megbízható kvantitatív és kvalitatív meghatározására.

1.5. Mikotoxikózisok és a mikotoxinoktól származó egészségkárosodás lehetőségei

1.5.1. Humán mikotoxikózis

A *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok nagyszámú mikotoxint termelnek, amelyek számos biológiai hatással rendelkeznek. A gabonafélék *F. graminearum* és *F. culmorum* okozta megbetegedésének következtében szintetizálódó mikotoxinok közül a legnagyobb mennyiségben előforduló DON elsősorban a hámjellegű szerveket károsítja, ami az ivarszervek, az emésztőrendszer, valamint a bőr fokozott érzékenységekben nyilvánul meg (Smalley et al. 1974).

A riboszómákhoz kötődő trichotecének a fehérjeszintézis során a transzlációs folyamat egy vagy több lépését is gátolják (Rotter et al. 1996). A DON toxikus hatása már 1 mg/kg alatti koncentrációban is jelentkezhet, és a legsúlyosabb esetben rákos megbetegedéseket (nyelőcsőrák) eredményezhet. A toxikus anyag immunrendszerre gyakorolt hatása az apatogén ágensekkel szembeni érzékenységekben nyilvánul meg, melynek során a gyógyszeres kezelés várt hatása elmarad.

A táplálkozási szokások megváltozása is növeli az akut toxikózisok fellépésének lehetőségét. Különös figyelmet kellene szentelni a teljes kiőrlésű korpataartalmú lisztekből készült sütőipari termékekre, müzlikre ill. egyéb cereáliák fogyasztására. Ezen

élelmiszeripari termékek veszélye abban rejlik, hogy a gabonaszemek beéréséhez közeli időszakban bekövetkező fertőzése esetén a mikotoxinok több mint 90 %-a perikarpiumban, azaz a maghéjban koncentrálódik, illetve őrléskor ebbe a frakcióba dúsul.

Az élelmiszeripari termékek toxintartalmának megbízható módszerekkel történő, fokozott ellenőrzését indokolja az tény is, hogy a DON nagymérvű hőstabilitással rendelkezik, így a sütés, valamint a hőkezelés technológiai művelete során sem bomlik le. A söripar alapanyagát képző, különböző gabonafélék is egészségügyi kockázatot jelenthetnek. Ezt az argentin sörök (50 minta) esetében végzett vizsgálatok is igazolták, ahol a minták közel 44 %-ából kimutatható volt a DON és a toxinszennyezett minták 18 %-a esetében 20 µg/l feletti toxinkoncentrációt detektáltak (Molto et al. 2000).

Az ösztrogén hatású toxinok fő képviselője a *F. graminearum* és *F. culmorum* által is termelt savanyú laktonok közül a ZEA, az α és β zearalenol, amelyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak egyes ösztrogén hatással rendelkező szteránvázis molekulákkal. A kora gyermekkorú kislányok estében tapasztalt emlőduzzadás és más tünetek ezen mikotoxinok szervezetben történő akkumulálódásával magyarázhatók. Klinikai receptoranalízissel bizonyították, hogy a vizsgált ösztrogén hatású mikotoxinok a 17 β -ösztradiol receptorhoz specifikusan kötődve váltják ki a rendellenességeket. A tünetek kialakulása egyértelműen a táplálkozási szokásokra volt visszavezethető, mivel a gyermekek étrendjében rendszeresen szerepelt müzli, olajos magvak és teljes kiőrlésű lisztből készült ételek, melyek zearalenont tartalmaztak (Szűts és mtsai. 1994).

Az USA-ban és Kanadában a humán élelmezésben is fontos szerepet játszó tisztítatlan búza esetében a maximálisan eltűrhető (MTL) DON koncentráció 2 mg/kg, míg a késztermékek tekintetében 1 mg/kg. Jelenleg az európai jogszabályozás nem tartalmazza a DON és ZEA tűréshatárokat (Canet 1993). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy több európai ország saját belső szabályozási rendszert fogadott el, mely rögzíti a DON és ZEA MTL értékeit. Ausztriában a DON szennyezettség elfogadható szintje az emberi fogyasztásra szánt kenyér búza (*Triticum aestivum* L.) és térszta búza (*Triticum durum* Desf.) tekintetében 0,5-0,75 mg/kg, a ZEA MTL értéke 0,06 mg/kg. A sertés hizlalására szolgáló takarmánynál 0,5 mg/kg takarmány, míg a kevésbé érzékeny húsbarmfi takarmányozására az 1,5 mg/kg DON kontamináció még elfogadható. Kiemelendő az élelmiszeriparban a legszigorúbb előírások szerint gyártható bébiételek kategóriája, ahol a határérték 0,02 mg/kg (Élelmezési Ipar 2000). A hatályos hazai előírásokat az 5. táblázat foglalja össze. Véleményünk szerint a takarmányok és az élelmezési búza esetében

halaszthatatlan feladat a DON és ZEA mikotoxinok kötelező kimutatásának bevezetése és határértékeinek rendeletekben történő rögzítése.

<i>Élelmiszercsoport</i>	<i>Mikotoxin megnevezése</i>	<i>Határérték (mg/kg)</i>
Étkezési korpa	dezoxinivalenol	1,20
Lisztek, őrlemények, müzli cereália része	dezoxinivalenol	1,00
	zearalenon	0,10
	T-2 toxin	0,30
Takarmányok (sertés és baromfi tápok, ill. takarmánykeverékek)	ochratoxin A	0,05
Takarmány alapanyagok	aflatoxin B ₁	0,05
	zearalenon	10,00
Baromfi- és sertéstápok a fiatal állatok kivételével	aflatoxin B ₁	0,02
Baromfi- és sertés kiegészítő takarmányok a fiatal állatok kivételével	aflatoxin B ₁	0,03
Sertés, lúd, kacs, pulyka és kedvtelésből tartott állatok tápjai	dezoxinivalenol	0,40
Nem tejelő, kérődző állatok és tyúkfélék (tojó, broiler) tápjai	dezoxinivalenol	2,00
Broilercsirke-, pulyka-, liba-, kacs-, tojótyúk-, egyéb madár-, és sertés hizlaló tápok	zearalenon	0,50

5. táblázat. Egyes élelmiszeripari termékek és takarmányok toxinszennyezettségére vonatkozó, Magyarországon kötelező határértékei (17/1999. (VI.16.) EüM rendelet, 25/1996. (IX. 4.) FM rendelet), valamint javasolt limitértékei (Magyar Takarmánykódex 90 I. kötet IV/B fejezet).

1.5.2. Állati mikotoxikózis

A trichotecének közül a DON főleg a sertések esetében súlyos tüneteket, takarmány-visszautasító és hánytató hatást, valamint vérzékenységet idéz elő (Hart et al. 1984). Számos toxikológiai tanulmány számol be arról, hogy a toxikózis az állatokban hasmenést, súlycsökkenést, vetélést, korai nemi érést, csontvelő károsodást, idegrendszert érintő működési zavarokat és jelentős mértékű elhullást okoz (Ikediobi et al. 1971, Romer

1986). A zearalenontól eltérően a trichotecének igen erős sejtmérgek, melyek különösen a hámszerveket károsítják, de súlyos esetben hányás és részleges takarmányvisszautasítás jelentkezhet. A trichotecének nagy része dermatotoxikus hatású, már μg -nyi mennyiség jelenléte bőrpirosodást, duzzadást, sőt bőrelhalást idéz elő. A trichotecének a szervezet immunrendszerét is károsítják: az immunglobulin A szint jelentős csökkenése figyelhető meg egerek esetében, ahol 13 héten keresztül 20 mg/kg DON tartalmú táplálékfelvétel mellett jelentős testsúlycsökkenés és vérzékenység is diagnosztizálható volt (Banotai et al. 1999), emellett humorális és celluláris immunválasz zavarokkal is számolni kell.

A zearalenont tartalmazó szálas és szemes takarmányok okozta toxikózis tekintetében számos állategészségügyi tapasztalat áll rendelkezésre, melyek méhnyagbódásról, méhelőreesésről, ivarzási zavarokról, vetelésről számolnak be. E toxin ösztrogén aktivitásával magyarázhatóak a reprodukciós zavarok, a spontán abortusz, a koraszülés és egyéb problémák kialakulása. Lényeges hatása az immunszuppresszív hatás, ami általában hirtelen kialakuló járványok (sertés hasmenés stb.) formájában nyilvánul meg (Bagneris et al. 1986, Gleissenthal et al. 1989, Miller et al. 1983). Az agyfűggelékben, a mellékvesekéregben és a pajzsmirigyben is kóros elváltozások jelentkezhetnek, amelyek arra utalnak, hogy a mikotoxin hatása a neuro-hormonális rendszeren keresztül is érvényesül. A tünetek súlyossága a toxinfelvétel időtartamától, ill. a takarmánybeli koncentrációtól függ. Patkányok esetében 20 μg ZEA adagolását (1 mg/testsúly kg) követő 7-20 nap között emlőtumor indukálódását figyelték meg (Hilakivi-Clarke et al. 1999).

A mikotoxinok okozta akut veszélyek tehát élelmezési és takarmányozási szempontból sem elhanyagolhatóak. A világszerte működtetett HACCP rendszer Magyarországon 2002. január 1-vel történő, kötelező jellegű (17/1999. (II.10.) FVM - EüM együttes rendelet) bevezetése a toxikózis veszélyét a minimumra csökkentheti, hiszen a megelőzésre (prevenció) helyezi a hangsúlyt (Sharma 1998).

1.6. A gomba biomassa és a toxintartalom előrejelzésének lehetőségei

Az előző fejezet pontjaiban kifejtettem, hogy a szántóföldeken, valamint a raktározás során jelentkező penészek által termelt másodlagos anyagcseretermékek közül a mikotoxinok az élelmiszerek és takarmányok révén milyen egészségügyi kockázatot idézhetnek elő. Az utóbbi néhány évtizedben az élelmiszer biztonság és élelmiszer mikrobiológia terén a HACCP rendszer és vele összefüggésben a prediktív mikrobiológia -

potenciálisan veszélyes mikotoxinok monitorozása - különös jelentőséggel bír. A HACCP rendszerhez kapcsolódó kockázatelemzés alkalmazása is nagyban elősegíti a mikrobiológiai veszélyek megelőzését.

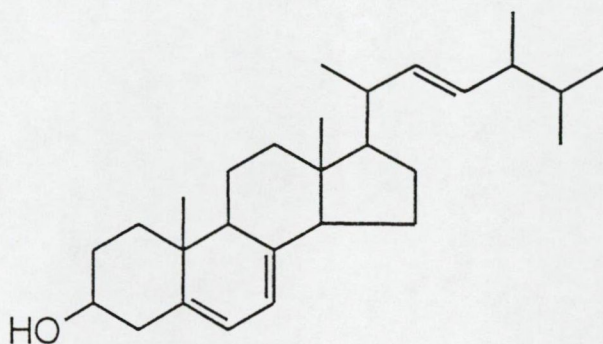
A penészgombák mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló módszerek közül a leggyakrabban alkalmazott eljárásokat a 6. táblázatban foglaltam össze.

<i>Cél</i>	<i>Módszer</i>
gomba biomassza mennyiségi meghatározása	élőpenészszám meghatározás, lemezöntéses módszer, mikroszkópikus detektálás (DEFT)
gombák kimutatása	ergoszterin, kitin, fertőzött szemek arányának vizuális értékelése, fertőzött szemek tömegarányának mérése
fajok meghatározása	mikroszkópos vizsgálat (morfológiai tulajdonságok) DNS/RNS meghatározási módszerek, biológiai tesztek, immunkémiai vizsgálatok

6. táblázat. A penészgombák kimutatására szolgáló legfontosabb módszerek

Az alkalmazható eljárásokról elmondható, hogy általában költségesek (vegyszerigény) és rendkívül időigényesek (pl. élőpenészszám meghatározás: 5 nap), és specifikusságuk miatt csak korlátozottan alkalmazhatók (ELISA). A gombák okozta kontamináció kimutatására a jelenleg alkalmazott módszerek közül az ergoszterin meghatározás bizonyult a legmegfelelőbbnek (Seitz et al. 1977). Az ergoszterin a membránlipidekhez kötött illetve szabad formában előforduló szterol (8. ábra), mely kizárólag a gomba sejtmembránjában van jelen és nem fordul elő sem baktériumokban, sem a növényi és állati sejtekben (Newell 1992). Az ergoszterin a gomba száraztömegének mintegy 0,2-0,6 %-át teszi ki, amit a micélium kora és a növekedési feltételek (környezeti tényezők) is jelentősen befolyásolnak (Schnürer 1995). A szerkezetét tekintve a lipidek közé sorolható ergoszterin mennyisége szoros korrelációt mutat a micélium száraztömeggel, a fungális telepszámmal (CFU), a hifa hosszal, a spóra számmal, a micéliális proteinek, a DON, a kitin, a CO₂-emisszió mértékével, a volutil szemcsék valamint egyes immunmarkerek mennyiségével (Börjesson

et al. 1990, Schnürer 1993, Young et al. 1984). Az ergoszterin jelenléte tehát egyértelműen fonalas gomba jelenlétére utal, ezért alkalmas lehet a gabonafélék egészségének minőségi osztályozására is. A kémiai felépítés szempontjából meghatározó 5,7 helyzetű kettőskötés miatt a HPLC elválasztás során 282 nm-en specifikus abszorpciós maximumot mutat (Newell et al. 1988, Schwandorf and Müller 1989).



8. ábra. Az ergoszterin szerkezeti képlete

Az ergoszterin mennyiségi meghatározására számos műszeres analitikai módszer áll rendelkezésre. Az ergoszterin kimutatására irányuló módszerek többségének alapját a minta alkoholos (metanol, etanol, propanol) közegben történő alkalikus elszappanosítása (NaOH, KOH) és pentánnal ill. hexánnal végzett extrakció adja (Seitz et al. 1977, 1979).

A gombafertőzött gabonaminták ergoszterin tartalmának TLC-s meghatározásakor az extrakciót követő toluol / aceton (9/1, v/v) eleggyel történő futtatást és fluoreszcenciás detektálást alkalmazva jóval nagyobb érzékenység érhető el, mint a HPLC/UV eljárásnál, hiszen a detektálási limit 250 ng/g (Rao et al. 1989, Sashidhar et al. 1988).

A reverz fázisú (C18) HPLC elválasztás során, különféle oldószerkeverekkel [metanol / víz; metanol / acetonitril / diklórmétán (23/23/4, v/v); hexán / izoamil-alkohol (19/1, v/v); hexán / propanol (97/3, v/v)] és diódasoros (UV) detektálással 282 nm-es hullámhosszon történik az ergoszterin meghatározása (Xu et al. 1988, Zill et al. 1988, Schwadorf et al. 1989, Anderson et al. 1994).

A C^{14} izotóppal jelölt gomba szterolok normál fázisú HPLC elválasztása során metanolos diklór-metán mozgófázis jelenlétében, radiometriás detektálással meghatározhatók, de az egyes szterolok GC-MS módszerrel is azonosíthatók (Peacock et al. 1989).

A különböző mintamátrixok szerves vegyületeinek extrakciója rendszerint hosszadalmas, nagy mintamennyiségeket igényel és oldószer igénye sem elhanyagolható. A mikrohullámú (microwave-assisted extraction, MAE) technika alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy az extrakció időtartamát lényegesen, 30-40 másodpercre csökkentjük (Young 1995).

A különböző szterolok (ergoszterin, dezmoszterol) GC/MS analízise során az alkalikus elszappanosítást és derivatizációt követően (TMS) SIM ionmódban a molekulaion (m/z 468, 470) és a jellemző fragmens ionok (m/z 337, 363, 253, 353, 365) monitorozása a célravezető (Weete et al. 1999).

Az analitikai eljárásoknál a mintatisztítás óriási jelentőségű, így a metanolos elszappanosítás és hexánnal történt extrakciót követően, a nitrogén alatt bepárolt mintákat diklórmetán / hexán (1/1, v/v) oldószerkeverékkel felvéve szilikagél töltetű oszlopon etil-éterrel eluálhatjuk. A mintában található ergoszterin piridin jelenlétében származékképezve (BSTFA) ún. „on column” gázkromatográfiás injektálást követően SIM ionmódban (m/z 337, 363, 325, 351) jól detektálható (detektálási limit 20 pg, Axelsson et al. 1995).

Saraf és mtsai. (1997) házi porok (house dust) esetében a gomba biomassza markereként az ergoszterin és zsírsav profil meghatározását választotta. Az eredmények alapján a GC/MS technikával meghatározott ergoszterin-trimetilszilil származék szintje (2-16,5 ng/mg) szoros korrelációt ($r=0,65$) mutatott a házi porban jelenlévő gombák mennyiségével (6-1400 CFU/mg por). A zsírsavak kvantitatív meghatározása során az ergoszterinéhez hasonló származékképzést alkalmazva 0,94-es korrelációs koefficiens volt a jellemző.

Mivel kutatómunkám fókuszába az analitikai mérések során kapott eredmények **gyakorlati hasznosításának** lehetősége került, ezért a továbbiakban az ergoszterin meghatározáson alapuló, mezőgazdasági, élelmiszeripari és takarmányozási szempontból jól hasznosítható, minősítési rendszereket kívánom áttekinteni.

Schnürer (1995) a gabonaminták ergoszterin tartalom alapján történő, minőségi besorolására irányuló kísérletsorozatának eredményeiből levont következtetések szerint a gabonafélék élelmiszeripari és takarmányozási célra történő hasznosításakor az egészségügyi kockázat minimálisra csökkenthető. A mintákban detektálható ergoszterin szint alapján négy minőségi osztályt alakítottak ki, mely magában foglalja az élelmiszeripari (< 5 mg/kg) és takarmányozási (5-10 mg/kg) felhasználásra alkalmas

szinteket, valamint rögzíti az egyes tételek továbbhasznosításból történő kizárásának határértékét (20 mg/kg felett, tüzelőanyag), végül kötelezően végrehajtandónak tekinti a multitoxin-analízist a 10-20 mg/kg-os tartományban, ahol a toxinprofil ismeretében hozható döntés a gabonafélék felhasználásáról.

Az állati eledelek mikológiai minősítésének az ergoszterin kvantitatív meghatározásán alapuló szabványosítása a gabonafélék körében végzett széleskörű felmérést követően, elsőként Franciaországban indult meg (AFNOR V18-112). Az ergoszterin mennyiségi meghatározását követően két minőségi kategóriát képeztek:

- „normál minőség”: a 8 mg/kg határérték alatti ergoszterin detektálásakor a gabonafélék mikotoxin kontaminációjának kockázatával nem kell számolni
- „kétséges minőség” („doubtful quality”): az ergoszterin 12 mg/kg feletti szintje a teljes körű mikotoxin monitorozást teszi szükségessé (Maupetit et al. 1993).

Miedaner et al. (1997) *F. graminearum* és *F. culmorum* izolátumokkal végzett üvegházi kísérletei során a mikotoxinokat (NIV, DON) gázkromatográfiás módszerrel GC-ECD, GC-MS detektálással, az ergoszterin tartalmat pedig HPLC módszerrel határozta meg. Véleményük szerint a fertőzőképesség és a DON tartalom között szoros, míg a fertőzőképesség és a DON/ergoszterin arány között gyenge korreláció mutatható ki. Ezen eredmények ellentétesek az előbbieken felsoroltakkal, így a minőségi kategóriák alapját képező paramétereket (DON, ergoszterin, szemfertőzőtség) és a közöttük lévő kapcsolatot önálló kísérleti munkám során kívántam megvizsgálni. A minőségi rendszer hazai viszonylatban történő adaptálási lehetőségeit későbbi mérési eredményeimmel kívánom alátámasztani (Lamper et al. 2000).

2. KÍSÉRLETI RÉSZ

2.1. Anyagok és módszerek

2.1.1. Az extraháláshoz és a műszeres analitikai vizsgálatokhoz felhasznált vegyszerek

◆ 18 MΩ ellenállású víz, töltetes víztisztító berendezéssel előállítva

(NanoPure II, Barnstead/Thermolyne Corp. Dubuque, IA, U.S.A.)

◆ dikálium-hidrogén-foszfát (K_2HPO_4), kálium-hidroxid (KOH), kálium-klorid (KCl), magnézium-szulfát ($MgSO_4 \times 7 H_2O$), nátrium-nitrát ($NaNO_3$), vas-szulfát (Fe_2SO_4), szacharóz (Reanal Rt., Budapest)

◆ neutrális alumínium oxid (Al_2O_3), aktív szén (Darco C₆₀), Celite 545, nátrium-tetraborát ($Na_2B_4O_7$), dezoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), ergoszterin, oktadekánsav, olajsav, hexadekánsav, dokozánsav, tetrakozánsav, tetradekánsav, ejkozánsav, üveggyapot, piridin (vízmentes), N,O-bis(trimetilszilil) trifluoracetamid (BSTFA), trimetilklórszilán (TMCS) (Sigma-Aldrich Kft. Budapest)

◆ acetonitril (ACN), metanol (MeOH), n-hexán, (Merck Kft, Budapest)

2.1.2. A mesterséges fertőzéshez felhasznált *Fusarium* izolátumok

Kísérleti munkám során a Gabonatermesztési Kutató Kht által rendelkezésemre bocsátott, eltérő patogenitású *Fusarium* izolátumokkal dolgoztam, melyek pontos azonosítási számait és az izolátumok származási helyét a 7. táblázat tartalmazza.

<i>Izolátum típusa</i>	<i>Az izolátumok származási helye</i>
F. graminearum No. 12377	Vésztő, Magyarország
F. graminearum No. 40	Univ. of Agricultural Sciences, Bécs, Ausztria
F. graminearum No. 44	Univ. of Agricultural Sciences, Bécs, Ausztria
F. graminearum No. 207	University of Hohenheim, Stuttgart, Németország
F. culmorum No. 12375	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. culmorum No. 12551	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. culmorum No. 89.4	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. culmorum No. 223	University of Hohenheim, Stuttgart, Németország
F. sporotrichioides	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. moniliforme	Dept. of Forest Path. Univ. Agr. Poznan, Lengyelország
F. sambucinum	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. acuminatum	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország

7. táblázat. A felhasznált *Fusarium* izolátumok és eredetük

2.1.3. Az inokulumok előállításának módja

A mesterséges fertőzéshez szükséges tenyészetek előállítása Czapek-Dox tápközeg (MSZ 6977 - 87) felhasználásával [120 g szacharóz, 12 g NaNO₃, 2 g MgSO₄, 2 g KCl, 0,04 g Fe₂SO₄, 4 g K₂HPO₄, pH= 7,2] 10 liter űrtartalmú Erlenmeyer lombikban történt Mesterházy et al. (1999) publikációja alapján. A tenyészeteket felhasználásig +4 °C-on hűtőszekrényben tároltuk.

2.1.4. A kísérletsorozatba vont búzafajták

A *Fusarium* fajok okozta megbetegedésekkel szemben eltérő rezisztenciával rendelkező, 20 őszi búzafajta genotípust [Sumey-3 (S3), GK Ságvári-Nobeoka Bozu x GK Mini Manó-S3 (Sgv-NB x MM-S3), Wuhan2, Sumey-3-81.60 x GK Kincső (S3-81.60 x Kincső), GK Bence, GK Kende, Ringó Sztár, GK Zugoly x Réka-Nobeoka Bozu (GK

Zugoly/Réka x NB), GK Kincső, GK Zugoly, GK Sámson, Jubilejnaja-50, GK Góbé, GK Rába, SK 8090, GK Őthalom, GK Táltos, GK Kalász] vontunk be a kísérletsorozatba.

2.1.5. A mesterséges inokuláció menete

A Gabonatermesztési Kutató Kht kecskéstelepi, tenyészkertjében, a virágzás időpontjában, az ismertetett különböző patogenitású *Fusarium* izolátumokkal (2.1.2.) mesterségesen fertőztünk különböző rezisztenciájú búzafajtákat (2.1.4.). Az eljárás során az egyes izolátumokat egymástól elkülönítve, 15-20 ml szuszpenzió formájában permetezzük a 15-20 kalászt tartalmazó kérékre, amelyeket az inokuláció időpontjában azonosító jellel láttunk el. A szintén jelöléssel ellátott kontrol kalászokat desztillált vízzel permetezzük le. A mesterséges fertőzést követően a kalázkévéket polietilén zsákokkal zártuk le, annak érdekében, hogy a *Fusariumok* fejlődéséhez szükséges optimális feltételeket biztosítsuk (hőmérséklet, páratartalom), majd ezeket 24 óra elteltével eltávolítottuk. A fertőzést követő 26. napon a kalászokat begyűjtöttük és mélyhűtőben (-20 °C) tároltuk a további felhasználásig (Mesterházy et al. 1999).

2.2. A kalász- és szemfertőzöttség vizuális meghatározása (bonitálás)

A tenyészkertben, az elkülönített parcellákban a *Fusariumokkal* végzett mesterséges fertőzést követően a 10., 14., 18., 22. és 26. napokon (Mesterházy 1988) vizsgáltuk a megbetegedés mértékét. A búzakarász és búzaszemek fertőzöttségének vizuálisan megállapított arányát százalékos formában, 0-4 terjedő skála alkalmazásával (0= infekció nem látható, 1= 25% fertőzöttség, 2= 50% fertőzöttség, 3= 75% fertőzöttség, 4= 100% fertőzöttség) kontroll búza minta jelenlétében értékeltük.

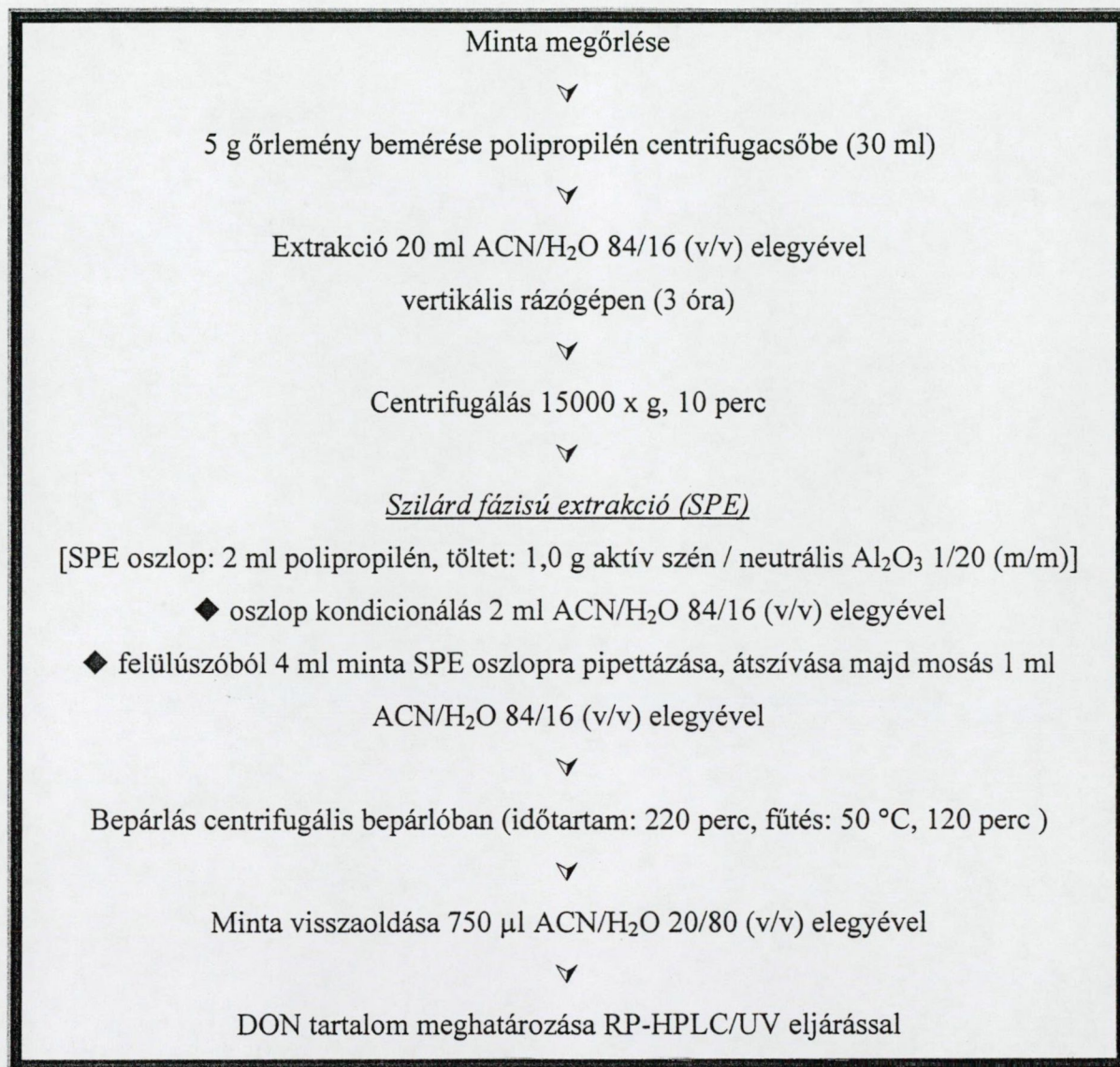
2.3. Búzaszem őrlmények extrakciója és DON tartalmának meghatározása

HPLC -vel

2.3.1. A DON extrakciója búzaszem őrlményekből

A vizsgálatok során elvégeztük a 2.1.2. pontban leírt, különböző patogenitású *Fusarium* izolátumokkal fertőzött búzaszem minták analízisét. A DON extrahálására

acetonitril / víz (84/16, v/v) elegyét valamint SPE extrakciót alkalmaztunk (9. ábra). A minta extraktumokat a mérésig (1-2 hét) + 4 °C-on hűtőszekrényben tároltuk.



9. ábra. Búzaszem őrlemények DON extrakciójának lépései

2.3.2. A DON RP-HPLC/UV meghatározásának körülményei

A DON nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása HP 1090 SeriesII típusú készülékkel történt. A készülék kétkomponensű grádiens pumpát, automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és diódasoros UV detektort tartalmazott. A mérési körülményeket a 8. és 9. táblázat tartalmazza.

előtét oszlop	Supelcosil C18, 20 x 2 mm x 18µm Sigma -Aldrich Kft, Budapest
analitikai oszlop	Hypersil ODS, 100 x 2 mm x 5 µm Hewlett-Packard Magyarország Kft, Budapest
oldószer A	víz
oldószer B	ACN
áramlási sebesség	0,500 ml/perc
detektálási hullámhossz	219 nm
oszloptermosztát hőmérséklete	41 °C
injektálási térfogat	50 µl

8. táblázat. Az RP-HPLC elválasztás jellemzői

<i>Idő (perc)</i>	<i>A oldószer (%)</i>	<i>B oldószer (%)</i>	<i>Áramlási sebesség ml/perc</i>
0,0	100,0	0,0	0,500
3,0	93,0	7,0	0,500
4,5	86,5	13,5	0,500
6,5	0,0	100,0	0,500
7,0	0,0	100,0	0,800
10,0	0,0	100,0	0,800
13,0	100,0	0,0	0,500

9. táblázat. Az elválasztás során alkalmazott grádiens

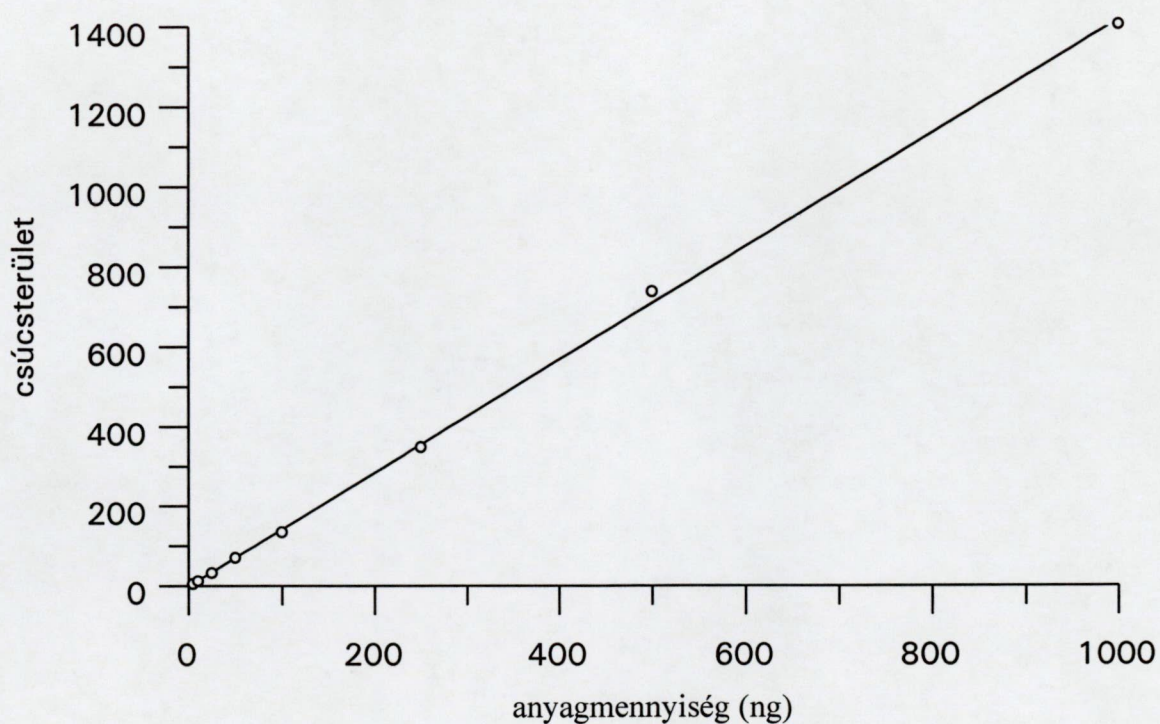
2.3.3. Kalibráció

A búza extraktumok DON tartalmának kvantitatív meghatározásához nyolc különböző koncentrációjú kalibrációs oldat RP-HPLC/UV meghatározását végeztük el (10. táblázat, 10. ábra). A kalibrációs sztenderd oldatok elkészítéséhez használt törzsoldat

koncentrációja 0,5 mg/ml ACN, az injektált anyagmennyiség 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 és 1000 ng volt.

<i>Kalibrációs szint</i>	<i>Anyagmennyiség (ng)</i>	<i>Csúcsterület</i>	<i>Anyagmennyiség/csúcsterület</i>
1.	5	6,22640	0,803032
2.	10	12,59524	0,793951
3.	25	32,63715	0,765998
4.	50	70,72383	0,706975
5.	100	134,68315	0,742483
6.	250	347,71375	0,718982
7.	500	738,59302	0,676963
8.	1000	1406,59558	0,710936

10. táblázat. A DON kalibrációja



10. ábra. A DON kalibrációs egyenese

2.4. A DON és NIV meghatározása búza mintákból CE módszerrel

2.4.1. A DON és NIV extrakciója búzaszem őrleményekből

A módszerfejlesztés során kipróbáltuk mind a nyers ACN / H₂O (84/16 v/v) extraktumok, mind a szilárd fázisú extrakcióval és bepárlással tisztított ill. töményített minták CE elválasztását. A gabona minták DON és NIV tartalmának CE meghatározásakor alkalmazott mintaelőkészítési lépések tulajdonképpen - a minta visszaoldásának kivételével - megegyeznek a DON HPLC meghatározásánál közöltekkel (8. ábra). A bepárolt mintákat 500 µl ACN-el visszaoldottuk, majd 500 µl borát pufferrel (85 mM, pH 9,2) történő hígítás után a CE készülék mintaadagoló fioláiba membránszűrtük.

2.4.2. A CE meghatározás körülményei

A DON és NIV CE meghatározására rendkívül érzékeny, új módszert dolgoztunk ki a Hewlett-Packard Magyarország Kft. demonstrációs HP ^{3D}CE típusú készülékének felhasználásával. A készülék automata mintaadagolót és diódasoros UV detektort tartalmazott. A mérési körülményeket a 11. táblázat mutatja.

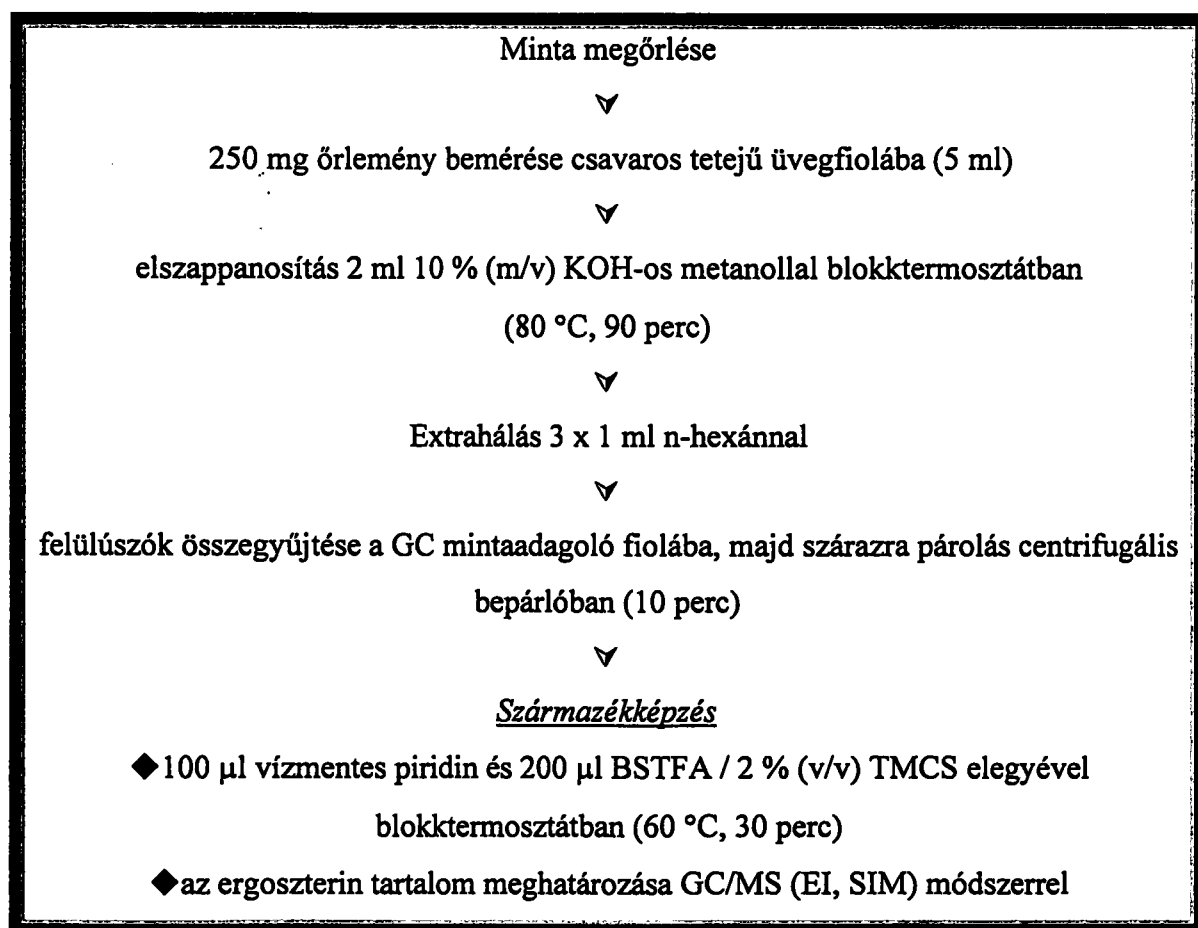
szeparációs oszlop	töltetlen, ömlesztett kvarc kapilláris, 67 cm x 75 µm
futtató puffer	85 mM borát puffer, pH= 9,2
feszültség	18,3 kV
detektor cella	ún. "high-sensitivity" detektor cella, 1200 µm optikai úthosszal
detektálási hullámhossz	214 nm
hőmérséklet	35 °C

11. táblázat. A CE elválasztás jellemzői

2.5. Az ergoszterin extrakciója búzából, származékképzése és GC/MS analízise

2.5.1. Az ergoszterin extrakciója búzaszem őrleményekből

A kísérleti tenyészkertből begyűjtött búzamintákat őrlést követően elszappanosítottuk, majd n-hexánnal extraháltuk és származékképzést követően GC/MS (EI, SIM) módszerrel analizáltuk (Pasanen et al. 1999). Az extrakciót és a származékképzés részleteit a 11. ábra mutatja.



11. ábra. Ergoszterin extrakciója búzaszem őrleményekből

2.5.2. A GC/MS meghatározás körülményei

A minták ergoszterin tartalmának kvantitatív meghatározása előtt GC/MS módszerfejlesztést hajtottunk végre, különböző hőmérsékleti és nyomásprogramokat tesztelve. A kromatogrammok kiértékelését és összehasonlítását követően a rutin mérések során a 12. táblázatban foglaltak szerint jártunk el.

<i>gázkromatográf</i>	HP 5989 SeriesII Plus
injektálás módja	ún. „splitless”
injektor hőmérséklete	290 °C
injektálási térfogat	1 µl
injektor nyomásprogram	25 psi, 0 perc, 99 psi/perc 35 psi- ig, 1,5 perc 99 psi/perc 6,0 psi- ig, 40,28 perc
ömlesztett kvarc kapilláris oszlop	HP-5MS (28,5 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
vivőgáz	hélium
oszloptermosztát fűtés programja	70 °C 2 perc 15°C/perc 200 °C-ig, 0 perc 6 °C/perc 290 °C-ig, 6 perc 20 °C/perc 300 °C-ig, 10 perc
GC/MS interface hőmérséklete	290 °C
<i>tömegspektrométer</i>	HP 5989B MS Engine
MS (EI) ionforrás hőmérséklete	200 °C
elektron ionizációs energia	70 eV
kvadrupól tömeg analizátor hőmérséklete	100 °C
ion figyelés módja	szelektív ion figyelés (SIM)
detektált ionok	m/z 337 és 363
elektronsokszorozó feszültsége	2008 V
nagyenergiájú dinóda (HED) feszültsége	7000 V

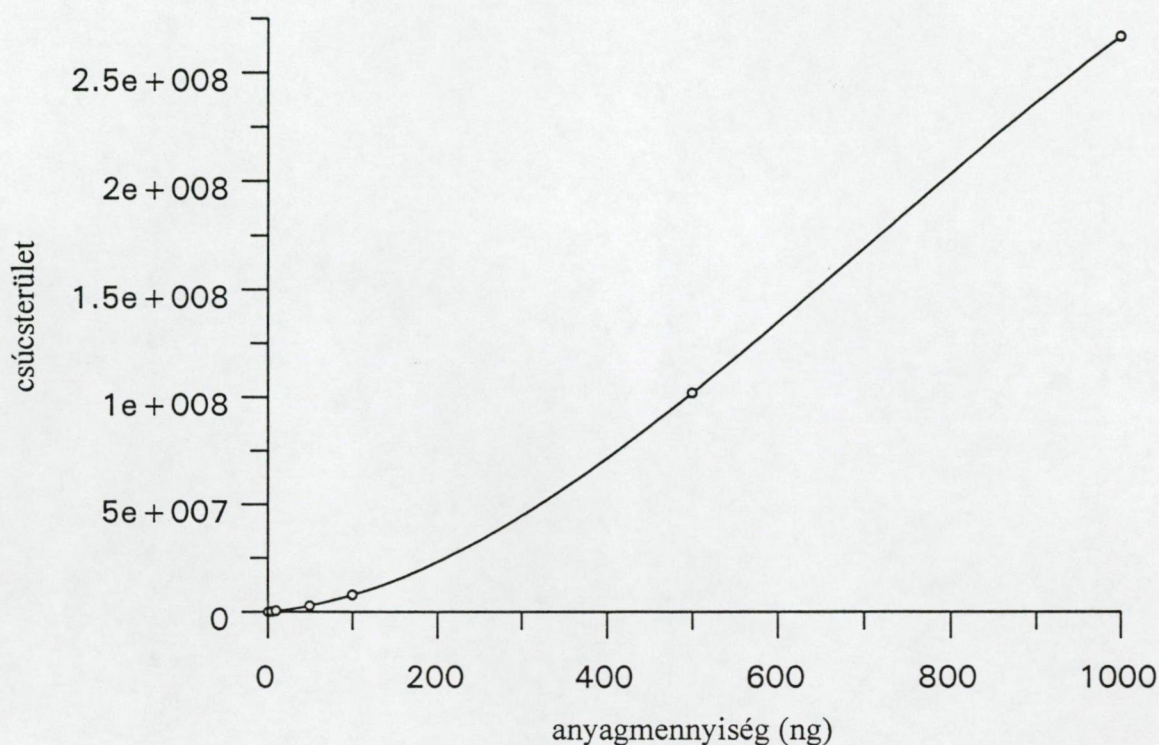
12. táblázat. GC/MS paraméterek

2.5.3. Kalibráció

A GC/MS kromatogrammok hat szintű kalibráció felhasználásával értékeltük ki (13. táblázat). A kalibrációs sztenderd oldatokat az 1 mg/ml (piridin / ACN 1/1, v/v) koncentrációjú törzsoldatból készítettük. Az injektált anyagmennyiségek a következők voltak: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500 és 1000 ng (12. ábra).

<i>Kalibrációs szint</i>	<i>Anyagmennyiség (ng)</i>	<i>Csúcsterület</i>
1.	1	21632
2.	5	170990
3.	10	532580
4.	50	3002719
5.	100	7764492
6.	500	102009950
7.	1000	266885082

13. táblázat. Az ergoszterin kalibrációs táblázata



12. ábra. Az ergoszterin kalibrációs görbéje

2.6. *Fusarium* izolátumok zsírsav és szteroid profiljának együttes GC/MS (EI, SIM) meghatározása

2.6.1. A kísérletsorozatba vont *Fusarium* izolátumok

A kísérleti munkám során a Gabonatermesztési Kutató Kht által a mesterséges fertőzésekhez leggyakrabban felhasznált, valamint külföldi génbankokból beszerzett *Fusarium* fajok és törzsek (14. táblázat) kemotaxonómiai szempontból igen fontos zsírsav és szteroid profilját kívántam vizsgálni. Az extrakcióhoz szükséges gomba biomassza mennyiséget a 2.1.3. pontban ismertetett tápközeg felhasználásával állítottuk elő.

<i>Izolátum típusa</i>	<i>Az izolátumok származási helye</i>
DISCOLOR szekció	
F. culmorum 223	Univ. of Hohenheim, Stuttgart, Németország
F. culmorum 12375	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. culmorum 89.4	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. culmorum 12551	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. graminearum 40	Univ. of Agricultural Sciencies, Bécs, Ausztria
F. graminearum 207	Univ. of Hohenheim, Stuttgart, Németország
F. graminearum 12377	Vésztő, Magyarország
F. graminearum 44	Univ. of Agricultural Sciencies, Bécs, Ausztria
F. crookwellense	Dept. of Forest Path. Univ. Agr. Poznan, Lengyelország
SPOROTRICHIELLA szekció	
F. sporotrichioides	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F. tricinctum	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
F poae	Gabonatermesztési Kutató Kht Szeged, Magyarország
LISEOLA szekció	
F. moniliforme	Dept. of Forest Path. Univ. Agr. Poznan, Lengyelország
F. nygamay	Dept. of Forest Path. Univ. Agr. Poznan, Lengyelország

14. táblázat. A kísérletsorozatba bevont *Fusarium* izolátumok és származási helyük

2.6.2. A zsírsavak és szteroidok extrakciója különböző *Fusarium* fajokból és izolátumokból

A zsírsavak és szteroidok extrakcióját és származékképzését a 2.5.1. pontban már ismertetett eljárás alapján végeztük.

2.6.3. A GC/MS meghatározás körülményei

A 2.5.2. pontban ismertetett mérési körülmények mellett a szteroidokra illetve az általunk meghatározónak ítélt egyes zsírsavakra [tetradekánsav (C14:0), hexadekánsav

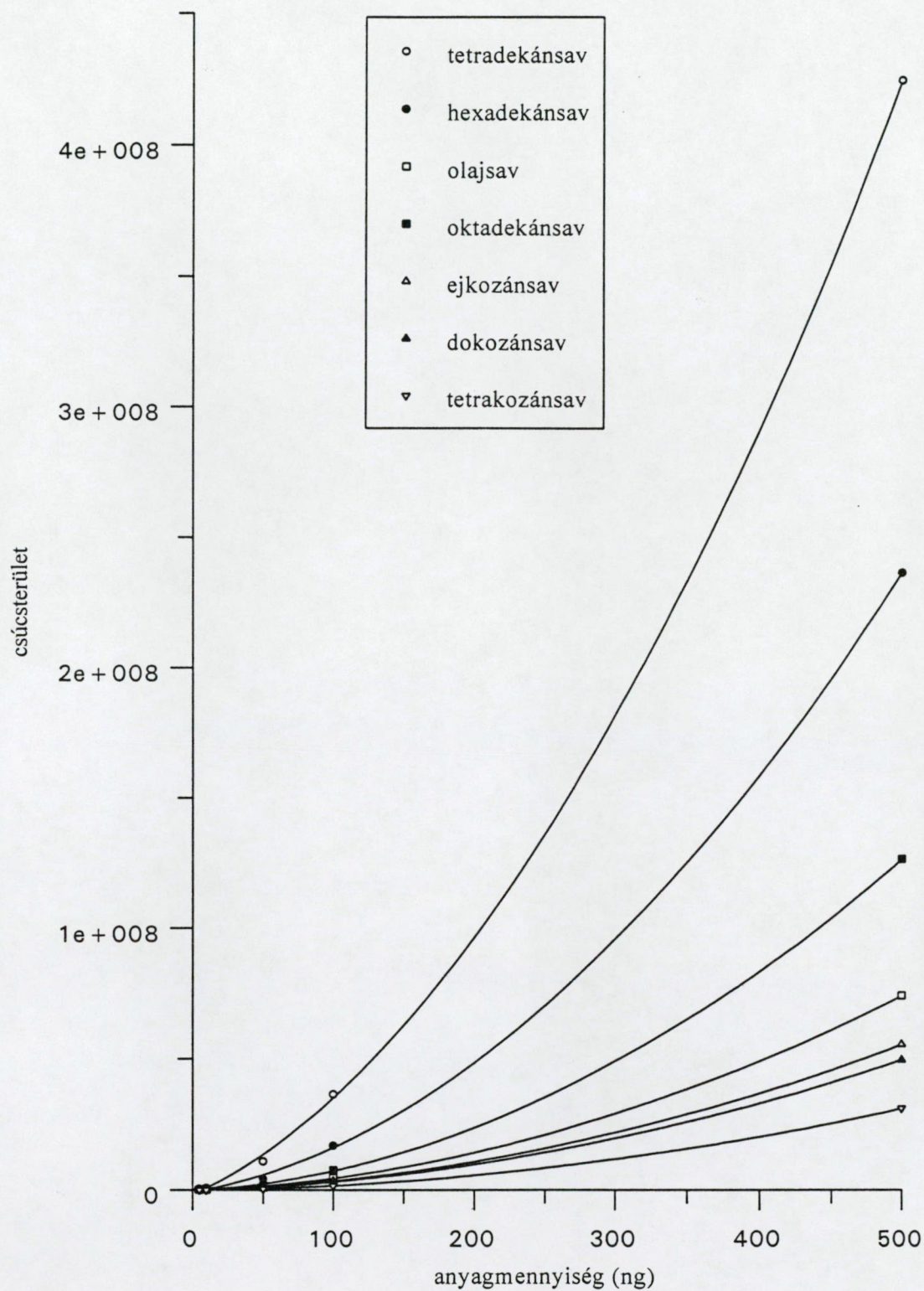
(C16:0), olajsav (C18:1), oktadekánsav (C18:0), dokozánsav (C22:0), tetrakozánsav (C24:0), ejkozánsav (C20:0)] jellemző karakterisztikus fragmens ionok figyelése (SIM) mellett végeztük el a GC/MS vizsgálatokat. Azon komponensek esetében, melyek sztenderdjei rendelkezésünkre álltak, előzetesen SCAN üzemmódban is méréseket végeztünk. A származékképzett sztenderd komponensek GC/MS (EI, SCAN) tömegspektrumai alapján kiválasztottuk a GC/MS (EI, SIM) mérésekhez a tömegspektrométer által figyelendő jellemző molekula és/vagy fragmens ionokat: tetradekánsav: m/z 300, 285, hexadekánsav: m/z 328, 313, olajsav: m/z 354, 339, oktadekánsav: m/z 356, 341, ejkozánsav: m/z 384, 369, dokozánsav: m/z 412, 397, tetrakozánsav: m/z 440, 425, ergoszterin: m/z 363, 337.

2.6.4. Kalibráció

Az eredmények kvantitatív kiértékeléséhez ötszintű kalibrációt készítettünk (13. ábra). A kalibrációhoz felhasznált n-hexán törzsoldat 1mg/ml töménységű volt. A törzsoldat hét zsírsavat (tetradekánsav, hexadekánsav, olajsav, oktadekánsav, ejkozánsav, dokozánsav, tetrakozánsav) és ergoszterin sztenderdet tartalmazott. Az injektált mintamennyiség komponensenként 5, 10, 50, 100 és 500 ng/μl volt (15. táblázat). Az ergoszterin kalibrációjára vonatkozó adatokat a 2.5.4. fejezetben közöltük.

Zsírsavak	Kalibrációs szintek (ng)				
	5	10	50	100	500
	Csúcsterület				
tetradekánsav	427116	789182	11003800	36557000	424630824
hexadekánsav	273006	392950	4307990	17004862	236619480
olajsav	76771	94344	1054230	4681558	74319657
oktadekánsav	80341	160792	1807467	7560808	126685252
ejkozánsav	28742	34022	801921	3569303	55613742
dokozánsav	15717	21537	599797	3288361	47987503
tetrakozánsav	11523	12504	343978	1662549	31076832

15. táblázat. A zsírsavak kalibrációs táblázata

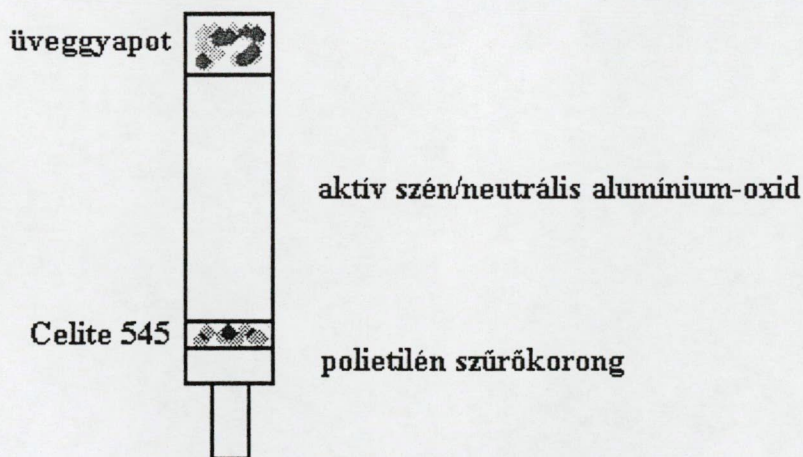


13. ábra. A zsírsavak kalibrációs görbéi

3. AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

3.1. Gyors mintaelőkészítési és HPLC mérési módszer a DON meghatározására

A célkitűzéseimnek megfelelően kutatómunkám során a DON szennyezettség kvantitatív meghatározására irányuló, sorozatvizsgálatok céljára kiválóan alkalmas, gyors, költségkímélő RP-HPLC elválasztási módszert dolgoztunk ki, beleértve a mintatisztítás lépéseit is. A Lauren és Greenhalgh (1987) által javasolt kétoszlopos (gyanta, aktív szén) SPE mintatisztítást helyett a laboratóriumunkban töltött, egy oszlopból álló, aktív szén és neutrális alumínium-oxid 1/20, (m/m) töltetű oszlopot alkalmaztuk. A polietilén cső aljára polietilén szűrő korongot helyeztünk, melyre Celite 545 réteget (2 mm) vittünk fel annak érdekében, hogy az aktív szén ne károsítsa a polietilén korongot. Az 1 g aktív szén/neutrális alumínium-oxid 1/20 (m/m) réteget üveggyapottal zártuk le (14. ábra). A töltet felületén adszorbeálódnak a mintamátrixban található, kimutatást zavaró komponensek (pl. pigmentek, zsírszerű anyagok), ugyanakkor a poláris mikotoxinok nem kötődnek a felülethez, eluálhatnak az oszlopról.

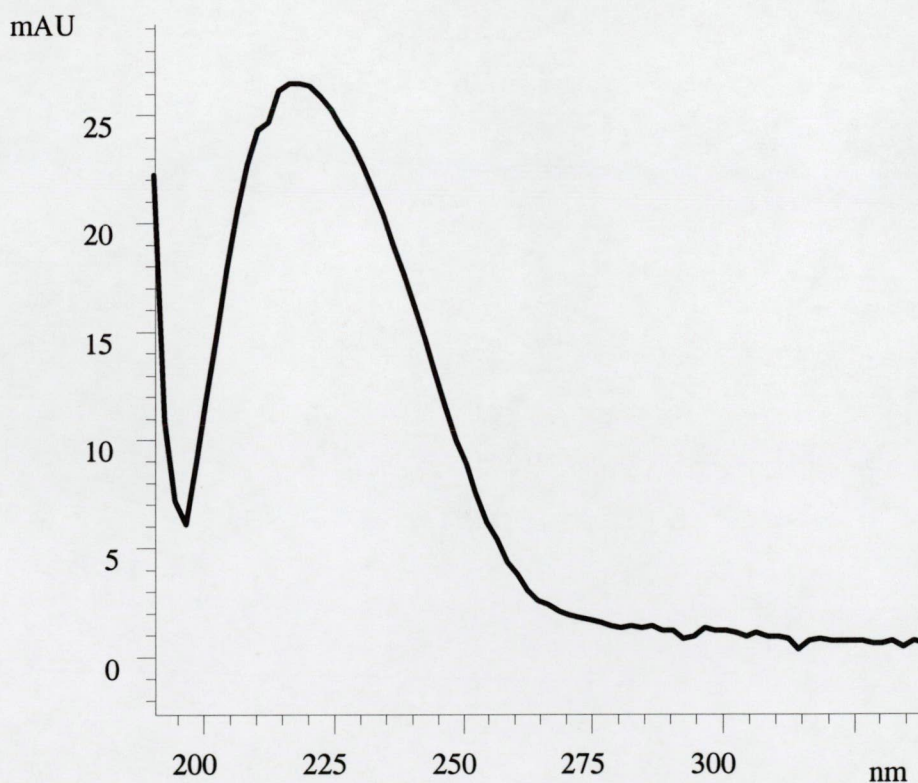


14. ábra. Az SPE oszlop felépítése

A minták műszeres mérését megelőzően ismert mennyiségű DON sztenderdeknek a kontroll mintákhoz történő hozzáadásával visszanyerési kísérletsorozatot hajtottunk végre (16. táblázat), majd RP-HPLC/UV (detektálási hullámhossz 219 nm) eljárással mértük a toxin tartalmat. A 15. ábrán a DON RP-HPLC elválasztás után kapott UV spektruma látható. Az átlagos visszanyerési érték 91,77 % volt, ebből adódóan a minták analízise utáni kvantitatív értékeléskor 1,0896 korrekciós faktorral számoltunk.

<i>Minta</i>	<i>Hozzáadott mennyiség (ng)</i>	<i>Visszanyert anyagmennyiség (ng)</i>	<i>Visszanyerés (%)</i>
1.	60,0	55,95	93,25
	60,0	56,78	94,63
	60,0	54,96	91,60
2.	600,0	540,03	90,05
	600,0	532,25	88,71
	600,0	554,25	92,38

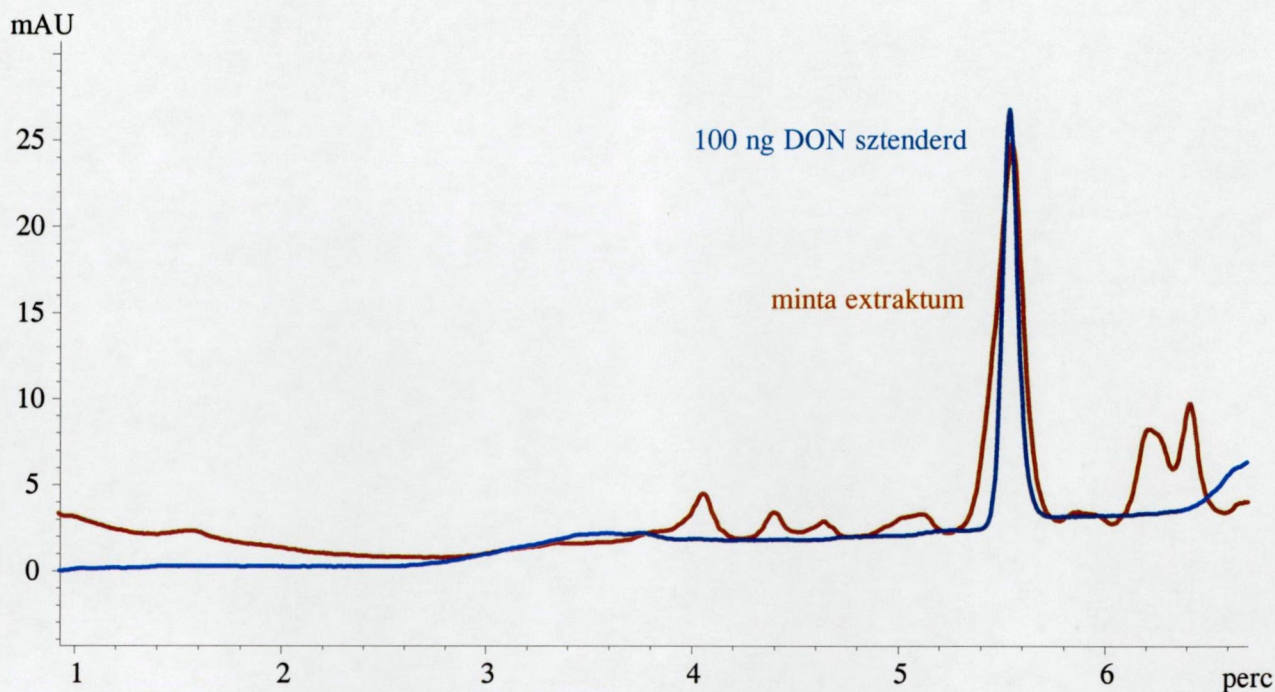
16. táblázat. A visszanyerési kísérlet eredményei



15. ábra. A DON UV spektruma ($\lambda_{\text{max}} = 218,5 \text{ nm}$)

A DON RP-HPLC/UV elválasztása során alkalmazott, általunk kidolgozott grádiens elúció eredményeképpen a DON retenciós ideje $5,5557 \pm 0,035$ percre csökkent, ami sorozatvizsgálatok esetében lényegesen csökkenti az analízis idejét.

A 16. ábrán egy DON sztenderd és egy DON tartalmú búzaszem minta extrakt RP-HPLC/UV (219 nm) elválasztásának kromatogramja látható.



16. ábra. A DON RP-HPLC/UV (219 nm) kromatogramja

3.2. Búzaszemek DON szennyeztsége, valamint szem-, és kalászfertőzöttsége közötti kapcsolat elemzése

A kutatómunkám során (1998-2001) évente mintegy 800-1000 fertőzött búzaminta sorozatvizsgálatát végeztem el. A kapott eredmények nagyfokú hasonlósága miatt csak az 1999. évre vonatkozó adatokat kívánom elemezni. A vizuálisan megállapított kalász- és szemfertőzöttség valamint a termésveszteség adatait százalékos formában, míg a műszeres analitikai módszerrel mért DON tartalmat mg/kg mértékegységben 12 *Fusarium* izolátum tekintetében, 20 búza genotípusra vetítve adom meg (17-20 táblázat, 17 ábra). A termésadatok a rezisztencia mértéke és az adott izolátum fertőzőképessége szerint igen jelentős eltérést mutatnak, 10% alatti és 100% feletti értékek egyaránt előfordultak. A 17. táblázat adatai alapján látható, hogy a legellenállóbb genotípusok termésüknek 90% feletti, míg a legfogékonyabbak 50% alatti mennyiségét voltak képesek megtartani. Az egyes izolátumok átlagadatai 42-82% között helyezkednek el. A négy paraméter összesítő adatai -

az elmúlt évekhez hasonlóan - a szemfertőzöttség és a DON tartalom közötti szoros korrelációról tanúskodnak (17. táblázat).

<i>Genotípus</i>	<i>Tulajdonság</i>			
	Kalászfert. (%)	Szemfert. (%)	DON (mg/kg)	Termésveszt. (%)
Sumey-3 (S3)	0,00	0,95	2,80	9,84
SgvNB x MM-S3	0,17	3,50	2,82	5,52
Sgv-NB x MM-S3	2,71	4,37	10,29	12,80
Wuhan2	3,68	3,92	3,69	8,67
S3-81.60X Kincső	6,58	2,34	4,29	17,13
S3-81.60 x Kincső	14,29	2,76	11,49	17,94
GK Bence	18,74	4,17	10,61	15,67
GK Őthalom	27,04	56,48	35,33	54,58
Ringó Sztár	27,46	12,64	11,25	30,72
GK Kincső	27,72	13,76	14,77	42,53
GK Sámson	30,19	16,86	18,29	46,22
GK Rába	30,86	37,89	30,20	39,88
GK Kende	32,49	13,66	10,61	35,98
GK Zugoly x Réka-NB	35,82	15,59	14,06	41,03
GK Góbé	37,29	37,97	28,86	45,07
Jubilejnaja-50	37,93	35,47	17,93	47,15
GK Táltos	39,04	51,81	41,74	47,11
GK Zugoly	41,50	14,13	15,26	48,35
GK Kalász	47,92	59,00	43,52	49,37
SK 8090	50,29	44,28	31,59	45,32
<i>Korreláció analízis</i>				
Paraméter	DON (mg/kg)	Szemfert. (%)	Kalászfert. (%)	
Szemfert. (%)	0.9284***			
Kalászfert. (%)	0.6778***	0.7410***		
Termésveszt. (%)	0.7144***	0.7941***	0.9079***	
*** P = 0.1 %				

A táblázatban a búzafajták megnevezésénél alkalmazott rövidítésekre vonatkozóan a 2.1.4. pontban adtam felvilágosítást

**17. táblázat. Kalászfuzárium rezisztenciateszt 12 *Fusarium* izolátummal szemben
(összefoglaló)**

Genotípus	Izolátumok												Átlag	Átlag
	F.c. 223	F.g. 207	F.g. 44	F.g. 40	F.c. 12551	F.c. 12375	F.c. 89.4	F.g. 12377	F. samb.	F. spor.	F. ac.	F. mon.	összes	Fg+Fc
Sumey-3 (S3)	12,31	6,53	2,55	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87	2,80
Sgv-NBxMM-S3	10,42	5,35	3,28	0,00	1,99	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	2,82
Wuhan2	6,64	12,00	4,18	1,98	1,10	0,64	0,00	2,98	0,00	0,73	0,77	0,59	2,63	3,69
S3-81.60xKincső	8,71	13,18	7,19	2,54	1,45	0,64	0,61	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	2,89	4,29
Sgv-NBxMM-S3	26,73	38,98	9,92	0,00	1,09	2,63	2,98	0,00	0,00	0,43	0,00	0,43	6,93	10,29
GK Bence	18,81	23,60	15,18	0,56	3,79	16,84	5,51	0,57	0,41	0,00	0,00	0,00	7,10	10,61
GK Kende	21,06	38,45	10,56	1,42	5,11	7,03	0,87	0,39	0,00	0,00	0,52	0,00	7,12	10,61
Ringó Sztár	31,63	36,57	10,11	2,00	2,18	5,14	1,21	1,20	0,74	0,68	0,00	0,00	7,62	11,25
S3-81.60xKincső	29,64	31,79	20,28	0,00	2,61	2,31	5,26	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	7,69	11,49
GK Zugoly/RékaNB	39,09	30,82	31,79	1,84	3,66	3,12	0,80	1,37	0,70	0,00	0,00	0,00	9,43	14,06
GK Kincső	36,82	16,69	21,03	13,44	14,517	3,31	0,43	11,94	0,38	0,91	0,66	0,00	10,01	14,77
GK Zugoly	34,36	38,88	4,81	2,06	20,76	18,46	0,78	1,94	2,94	0,00	0,64	0,39	10,50	15,26
GK Sámson	32,04	0,91	73,76	2,23	4,88	6,74	25,18	0,57	0,47	0,00	0,00	0,00	12,23	18,29
Jubilejnaja-50	69,61	0,00	33,36	14,42	12,71	9,55	3,80	0,00	1,40	3,58	0,00	0,00	12,37	17,93
GK Góbé	65,96	32,60	40,49	40,14	38,63	10,35	1,55	1,17	0,00	0,00	0,00	0,00	19,24	28,86
GK Rába	79,32	59,25	33,20	37,57	17,74	11,93	1,94	0,69	0,88	1,45	1,91	0,00	20,49	30,20
SK 8090	90,18	77,02	28,67	5,1	26,9	19,6	4,68	0,7	0,76	0,90	0,00	0,74	21,26	31,59
GK Öthalom	43,79	49,99	45,15	53,49	31,01	15,25	19,43	24,51	0,00	0,50	0,00	0,60	23,64	35,33
GK Tálto	54,42	73,75	59,86	79,13	41,37	20,89	1,04	3,43	2,04	0,98	0,00	0,00	28,08	41,74
GK Kalász	73,28	79,14	48,12	63,21	48,17	31,70	0,00	4,51	3,46	0,00	0,00	0,00	29,30	43,52
Átlag	39,24	33,28	25,17	16,05	13,98	9,43	3,80	2,80	0,75	0,51	0,23	0,14	12,11	16,82

A genotípusok pontos megnevezése a 2.1.4. pontban van részletezve.

F.c. = F. culmorum, F.g. = F. graminearum, F. samb. = F. sambucinum, F. spor. = F. sporotrichioides, F. ac. = F. acuminatum, F. mon. = F. moniliforme

18. táblázat. A 12 izolátumos kalászfuzárium fajtarezisztencia teszt DON eredményei (mg/kg, 1999)

<i>Genotípus</i>	<i>Izolátumok</i>												Átlag
	F.c. 223	F.g. 207	F.g. 44	F.g. 40	F.c. 12551	F.c. 12375	F.c. 89.4	F.g. 12377	F. samb.	F. spor.	F. ac.	F. mon.	
Sumey-3 (S3)	1,33	3,67	0,33	0,00	0,00	2,33	0,03	0,03	0,00	0,03	3,67	0,00	0,95
S3-81.60x Kincső	8,33	3,67	8,33	2,00	0,00	1,73	1,67	0,33	0,00	0,33	1,67	0,00	2,34
S3-81.60x Kincső	10,00	6,67	8,33	1,00	0,37	0,00	4,33	0,03	0,03	0,00	2,33	0,00	2,76
Sgv-NBxMM-S3	7,00	6,67	5,00	0,67	0,00	0,33	3,67	0,00	4,00	0,33	11,67	2,33	3,50
Wuhan2	6,67	6,00	13,33	0,67	0,33	3,67	5,00	0,03	0,33	6,67	4,33	0,00	3,92
GK Bence	8,33	16,67	8,33	0,33	0,67	2,33	11,67	0,33	0,67	0,33	0,33	0,00	4,17
Sgv-NBxMM-S3	13,33	4,33	6,67	0,03	0,67	4,33	3,67	0,67	1,67	0,33	16,67	0,03	4,37
Ringo Sztár	36,67	50,00	11,67	0,03	3,00	2,33	21,67	1,33	13,33	2,33	4,33	5,00	12,64
GK Kende	46,67	43,33	26,67	13,33	5,33	2,00	23,33	2,33	0,83	0,00	0,03	0,00	13,66
GK Kincső	26,67	18,33	11,67	53,33	15,00	6,67	10,33	16,67	2,33	0,67	3,00	0,40	13,76
GK Zugoly	18,33	8,33	33,33	0,07	6,67	76,67	3,67	1,67	18,33	1,70	0,70	0,20	14,14
GK Zugoly/RékaxNB	43,33	53,33	46,67	3,67	3,00	6,67	23,33	0,67	4,33	0,03	2,00	0,00	15,59
GK Sámson	1,67	40,00	83,33	3,67	0,33	0,33	60,00	0,00	3,00	0,00	10,00	0,00	16,86
Jubilejnaja-50	76,67	76,67	80,00	36,67	16,67	21,67	66,67	2,33	1,67	23,33	11,67	11,67	35,47
GK Rába	96,67	96,67	73,33	60,00	7,33	8,33	43,33	0,00	0,37	0,33	15,00	53,33	37,89
GK Góbé	81,67	80,00	85,00	73,33	70,00	26,00	13,33	2,33	1,67	3,67	15,00	3,67	37,97
SK8090	100,00	100,00	86,67	1,00	28,33	40,00	76,67	0,00	86,67	0,33	11,67	0,00	44,28
GK Táltos	80,00	73,33	86,67	100,00	80,00	70,00	70,00	1,33	8,33	8,67	20,00	23,33	51,81
GK Őthalom	100,00	100,00	100,00	100,00	80,00	40,00	93,33	53,33	0,70	0,37	5,00	5,00	56,48
GK Kalász	100,00	86,67	100,00	86,67	66,67	23,33	96,67	7,00	5,33	2,33	46,67	86,67	59,00
Átlag	43,17	43,72	43,77	26,82	19,24	16,94	31,62	4,52	7,68	2,59	9,29	9,58	21,58

A genotípusok pontos megnevezése a 2.1.4. pontban van részletezve.

F.c. = F. culmorum, F.g. = F. graminearum, F. samb. = F. sambucinum, F. spor. = F. sporotrichioides, F. ac. = F. acuminatum, F. mon. = F. moniliforme

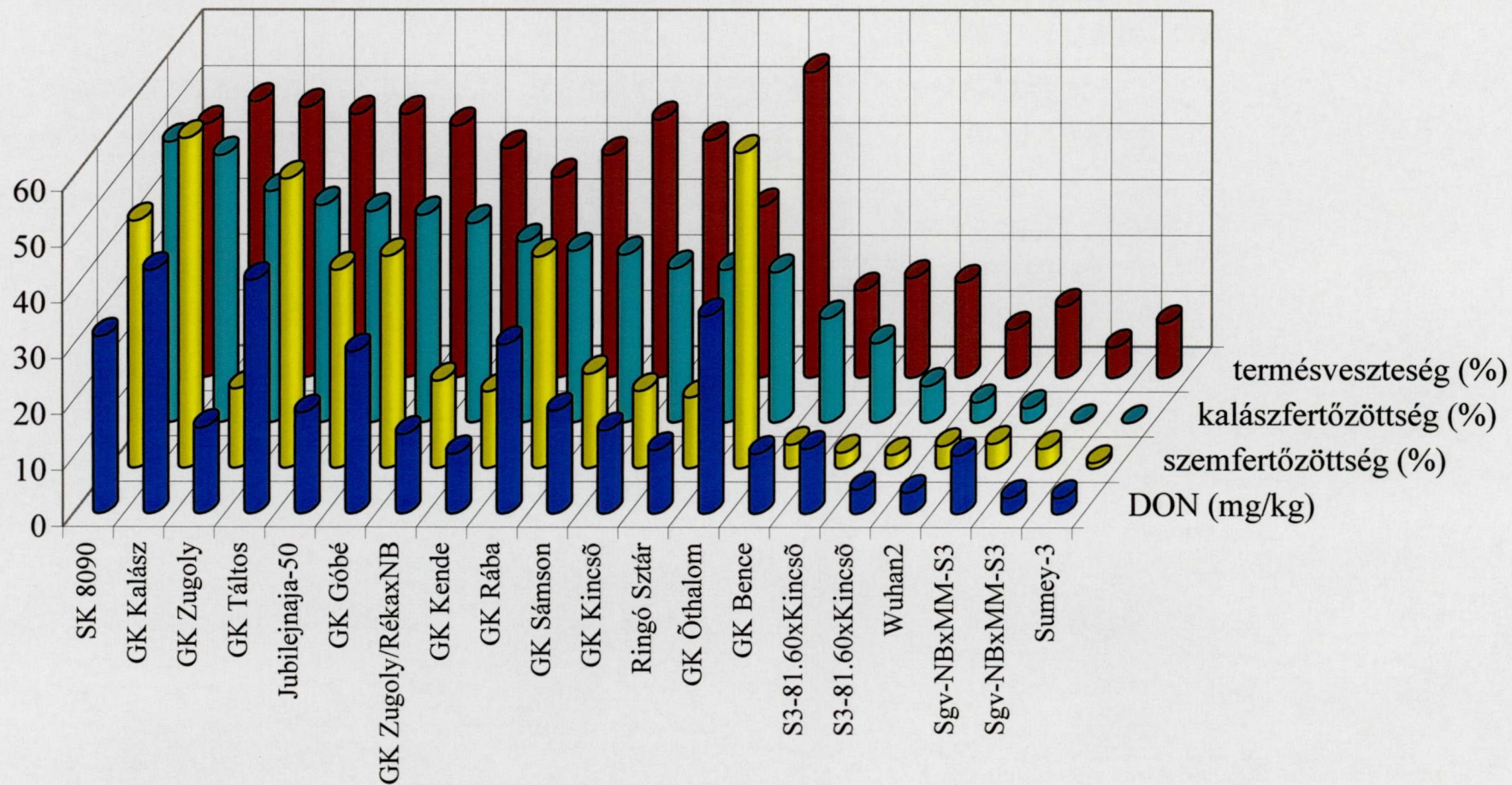
19. táblázat. A 12 izolátumos kalászfuzárium rezisztenciakísértlet szemfertőzöttségi adatai (% , 1999)

<i>Genotípus</i>	<i>Fusarium</i> fajok, izolátumok												Átlag
	F.c. 223	F.g. 207	F.g. 44	F.g. 40	F.c. 12551	F.c. 12375	F.c. 89.4	F.g. 12377	F. samb.	F. spor.	F. ac.	F. mon.	
Sumey 3 (S3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sgv-NBxMM-S3	0,83	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17
Sgv-NBxMM-S3	8,00	6,83	1,50	0,17	0,00	0,00	16,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,71
Wuhan2	6,83	12,50	5,50	2,83	2,50	0,50	13,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,68
S3-81.60xKincső	8,67	17,17	25,33	1,50	0,67	0,00	19,67	0,00	5,67	0,33	0,00	0,00	6,58
S3-81.60xKincső	38,33	34,67	34,00	0,67	0,67	17,50	27,17	0,00	12,00	0,00	6,50	0,00	14,29
GK Bence	43,33	48,17	36,83	0,33	13,33	13,67	45,83	0,00	12,17	4,83	4,33	2,00	18,74
GK Őthalom	54,58	58,75	31,33	42,67	27,00	19,83	37,33	14,83	7,83	10,67	15,00	4,67	27,04
Ringo Sztár	55,00	55,83	47,17	1,67	22,00	32,17	56,67	0,50	26,67	15,83	16,00	0,00	27,46
GK Kincső	39,58	53,33	43,17	60,00	37,67	13,75	23,08	26,75	11,67	7,45	9,58	6,58	27,72
GK Sámson	61,83	58,83	49,83	13,00	18,67	31,83	60,83	4,33	38,17	9,00	14,00	2,00	30,19
GK Rába	56,00	54,67	58,00	39,83	17,33	18,00	56,17	0,00	11,83	16,50	13,50	28,50	30,86
GK Kende	61,00	56,50	46,67	6,00	18,33	64,50	47,83	0,00	46,17	22,67	13,50	6,67	32,49
GK Zugoly/RékaxNB	60,00	63,83	58,00	16,33	31,33	42,67	55,17	0,33	33,17	23,17	32,83	13,00	35,82
GK Góbé	67,17	70,83	64,17	47,67	33,17	25,67	53,67	5,17	9,33	19,50	27,17	24,00	37,29
Jubilejnaja 50	66,83	72,50	66,00	38,00	34,67	30,83	48,83	3,00	8,50	23,50	28,33	34,17	37,93
GK Táltos	59,33	61,17	56,33	50,33	38,33	37,17	50,33	3,00	14,00	29,50	35,00	34,00	39,04
GK Zugoly	66,33	63,33	57,00	26,17	42,33	43,00	56,00	16,17	39,17	35,17	31,67	21,67	41,50
GK Kalász	75,83	80,00	85,83	52,33	47,67	36,00	73,33	14,33	11,50	26,00	37,50	34,73	47,92
SK 8090	90,83	85,83	70,67	16,50	65,33	51,67	81,67	12,17	51,00	28,33	36,00	13,50	50,29
Átlag	46,02	47,77	41,87	20,80	22,55	23,94	41,18	5,03	16,94	13,62	16,05	11,27	25,59

A genotípusok pontos megnevezése a 2.1.4. pontban van részletezve.

F.c. = *F. culmorum*, F.g. = *F. graminearum*, F. samb. = *F. sambucinum*, F. spor. = *F. sporotrichioides*, F. ac. = *F. acuminatum*, F. mon. = *F. moniliforme*

20. táblázat. A 12 izolátumos kalászfuzárium rezisztenciakísértlet kalászfertőzöttségi adatai (% , 1999)



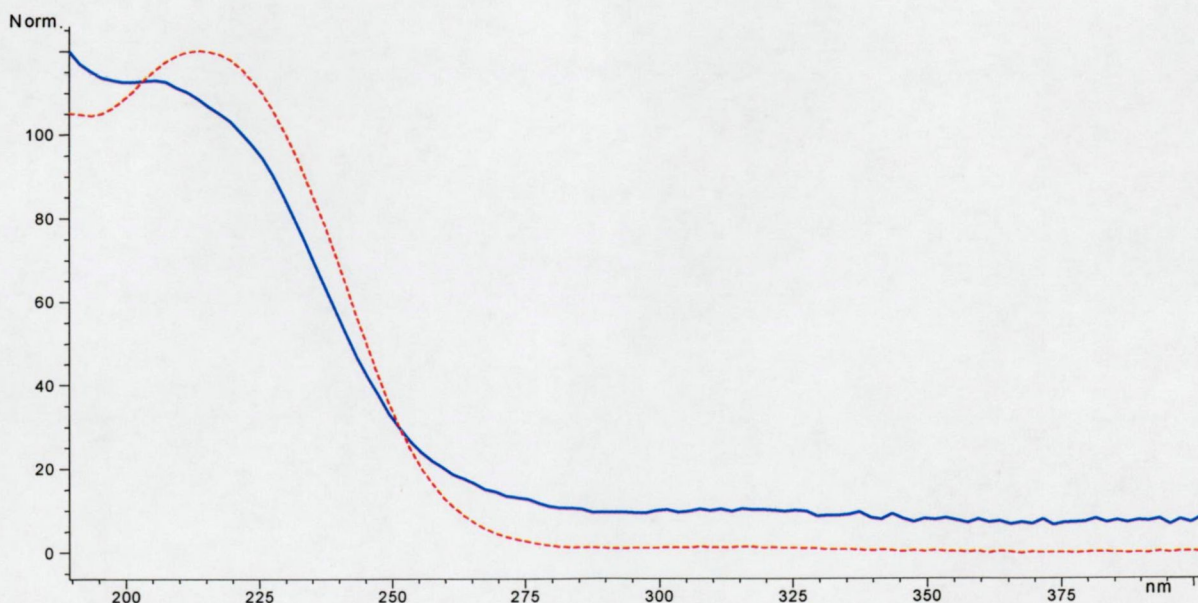
17. ábra. Kalászfuzárium rezisztencia *Fusarium* fajokkal szemben
(átlagadatok, 1999)

A betakarításhoz közeli időpontban kialakult erőteljes esőzések a GK Őthalom esetében a szemfertőzöttség mértékét elvárásainknak megfelelően lényegesen megnövelték. A GK Kende, valamint a GK Zugoly x Réka- Nobeoka Bozu szemei a nagyfokú kalászfertőzöttség ellenére kevésbé fertőződtek (17. ábra), ami a szemfertőződéssel szembeni rezisztenciafaktor jelenlétével magyarázható. A legellenállóbb fajták az elvárásainknak megfelelően reagáltak a fertőzésekre, azaz minden mért paraméter tekintetében kiválóak voltak. A szenzitív fajtáknál rendkívül erőteljes kalász- és szemfertőzöttség figyelhető meg, melyhez általában magas DON tartalom is társult (17. ábra). Ha az izolátumok szerinti adatokat összegezni kívánjuk, az 1998 évi mérésekhez hasonlóan, az egyes paraméterek $r = 0,90$ feletti összefüggést adnak. A patogenitás tekintetében a szemfertőzöttség és DON kapcsolat a legszorosabb, a termésveszteség és kalászfertőzöttség közötti korreláció az egyes rezisztencia faktorok jelenléte miatt gyengébb. A mérési eredmények alapján látható, hogy a legagresszívebb izolátumoknál 70-90 mg/kg DON tartalom is előfordul - a jelenleg javasolt egészségügyi határértéket 40-szerese- melyhez már komoly egészségügyi kockázat társul. A gyenge fertőzőképességű fajok DON termelése rendkívül alacsony vagy nulla volt, azaz a keresztfertőződés a megelőző évekhez viszonyítva ritkábban fordult elő. A *F. culmorum* 223 -as és a *F. graminearum* 207 -es izolátuma rendkívül erőteljes fertőződést, és még a legellenállóbb fajtáknál is 6-12 mg/kg DON felhalmozást okozott (18. táblázat). A táblázat adatainak alapján az átlagos DON tartalom 2,8-43,5 mg/kg között mozgott. Az eredmények továbbá igazolják azt is, hogy a *Fusarium* rezisztencia nem fajspecifikus, azaz több *Fusarium* fajjal szemben is védettséget ad. Ez a nemesítés szempontjából azt jelenti, hogy elegendő egy igen patogén *Fusariummal* fajjal szembeni ellenállóságra szelektálni. A 19. táblázatban a szemfertőzöttségi adatokat mutatjuk be. Az 1999 év az elmúlt évekhez viszonyítva a legcsapadékosabb volt, így a szenzitív fajták szemfertőzöttsége gyakran a 100%-ot is elérte. A legfogékonyabb genotípusokon a *F. acuminatum* is jelentős fertőződést tudott előidézni, habár ennek aránya lényegesen elmaradt a rendkívül patogén *F. graminearum* és *F. culmorum* izolátumaitól. A legellenállóbb genotípusok a járvány kialakulásának rendkívül kedvező időjárás ellenére, még a legagresszívebb izolátumokkal szemben is rezisztenciát mutattak, ezért a fertőzöttség mértéke csekély volt. A bonitálással meghatározott kalászfertőzöttségi értékek az 1998. évhez viszonyítva csaknem kétszer magasabbak voltak. A legellenállóbb fajták közül csak két genotípus esetében (Sumey-3, saját szelektálású GK Ságvári Nobeoka Bozu x Mini Manó-Sumey-3 törzs) értünk el 1 %

alatti fertőzöttséget. Az 1999-es év az azt megelőző évekhez viszonyítva rendkívül csapadékos volt, így a legfogékonyabb fajták esetében (GK Öthalom, GK Kalász) a kalászfertőzöttség a 60 %-ot is elérte (17. ábra). A legfogékonyabb genotípusokon az *F. acuminatum* is jelentős kalászfertőzést tudott előidézni, ugyanakkor ennek mértéke lényegesen elmarad a *F. graminearum* és *F. culmorum* agresszív izolátumok mögött (20. táblázat). Mind a fajta mind az izolátum különbségek nagymértékben szignifikánsak ($P=0,1\%$), mely a további (2000, 2001 év) kísérleti tervezések alapját képezi. A fenti információk birtokában a DON nagyműszeres meghatározására rendkívül nagy hangsúlyt fektettünk, mely többlépcsős módszerfejlesztést (extrahálás, elválasztási körülmények) követően, a búza nemesítés szempontjából meghatározó szelektálások alapját képezi.

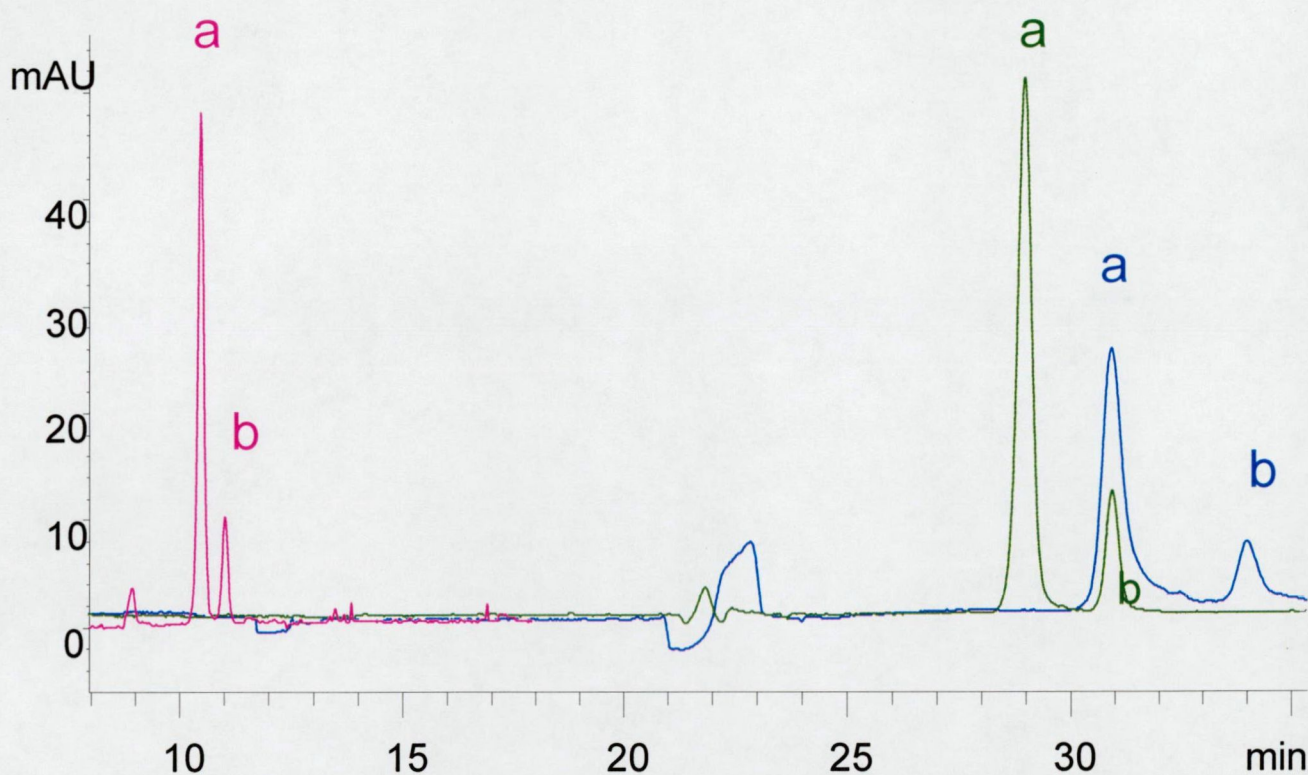
3.3. Új CE eljárás a DON és NIV együttes meghatározására

A *Fusarium* fajok egy része a DON mellett más mikotoxinokat is - a leggyakrabban nivalenolt (NIV) - termelhet. Ezen két mikotoxin kémiai szerkezete rendkívül hasonló és HPLC módszert alkalmazva a két komponenes közel eluálódik egymáshoz (Szűts és Bartók 1995), valamint a NIV általában együtt eluálódik egyes mátrix komponensekkel, mely a kiértékelést nehezíti. Ezt a feladatot a CE kvarc kapilláris oszlopok nagy hatékonyságának a kiaknázásával kívántuk megoldani a rendelkezésünkre bocsátott HP ^{3D}CE készülékkel. A DON és NIV CE elválasztás után kapott UV spektruma a 18. ábrán látható.



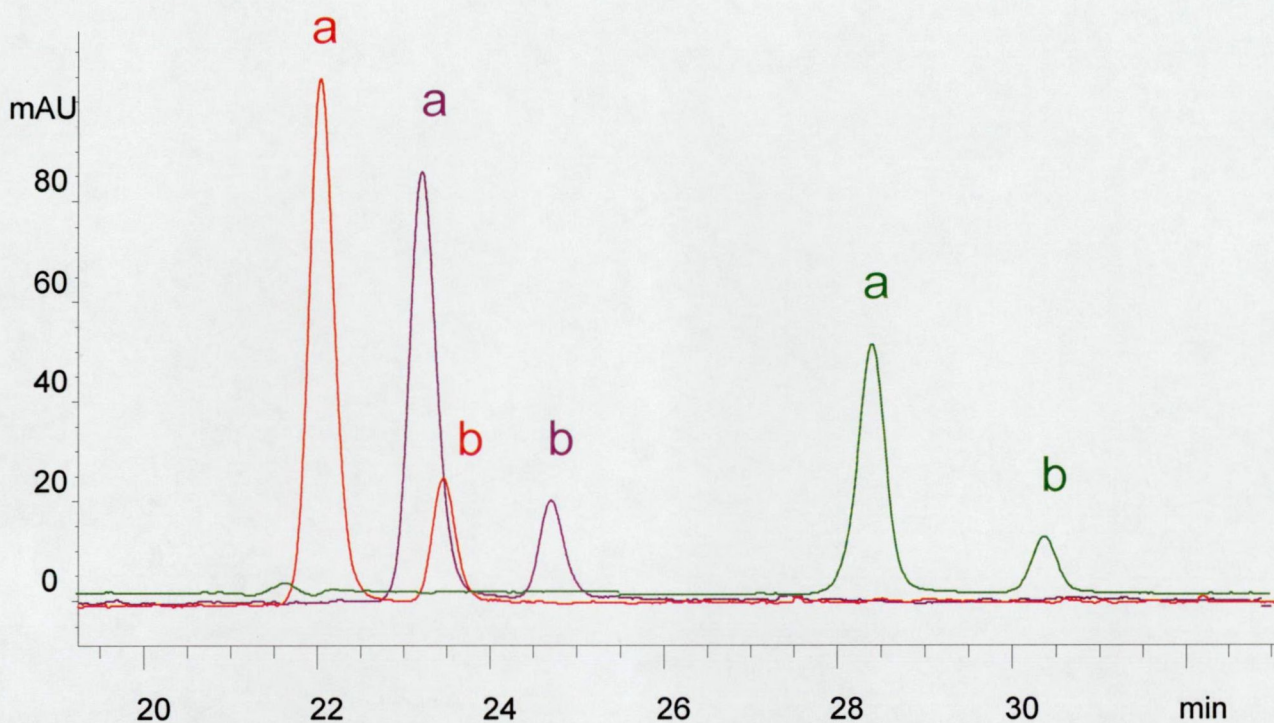
18. ábra. A **DON** és **NIV** CE/UV spektruma (λ_{\max} DON 213,5 nm, λ_{\max} NIV 205,5 nm)

A CE módszerfejlesztés során a pufferösszetétel (19. ábra), az áramerősség (20. ábra), és az injektálási módszernek (21. ábra) az elválasztásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az elválasztáshoz felhasznált ömlesztett kvarc kapilláris bemeneti vége pozitív potenciálon volt. A 19. ábrán nyomonkövethetjük a puffer koncentrációjának és összetételének a komponensek migrációs idejére és elválasztásukra gyakorolt hatását. Az ábra világosan mutatja, hogy a puffer koncentráció növekedése növeli mind a felbontást, mind a komponensek migrációs idejét. A CE pufferekben szerves módosítóként gyakran alkalmazott MeOH megnövelte a felbontást, de jelentős csúcskiszélesedést is eredményezett.



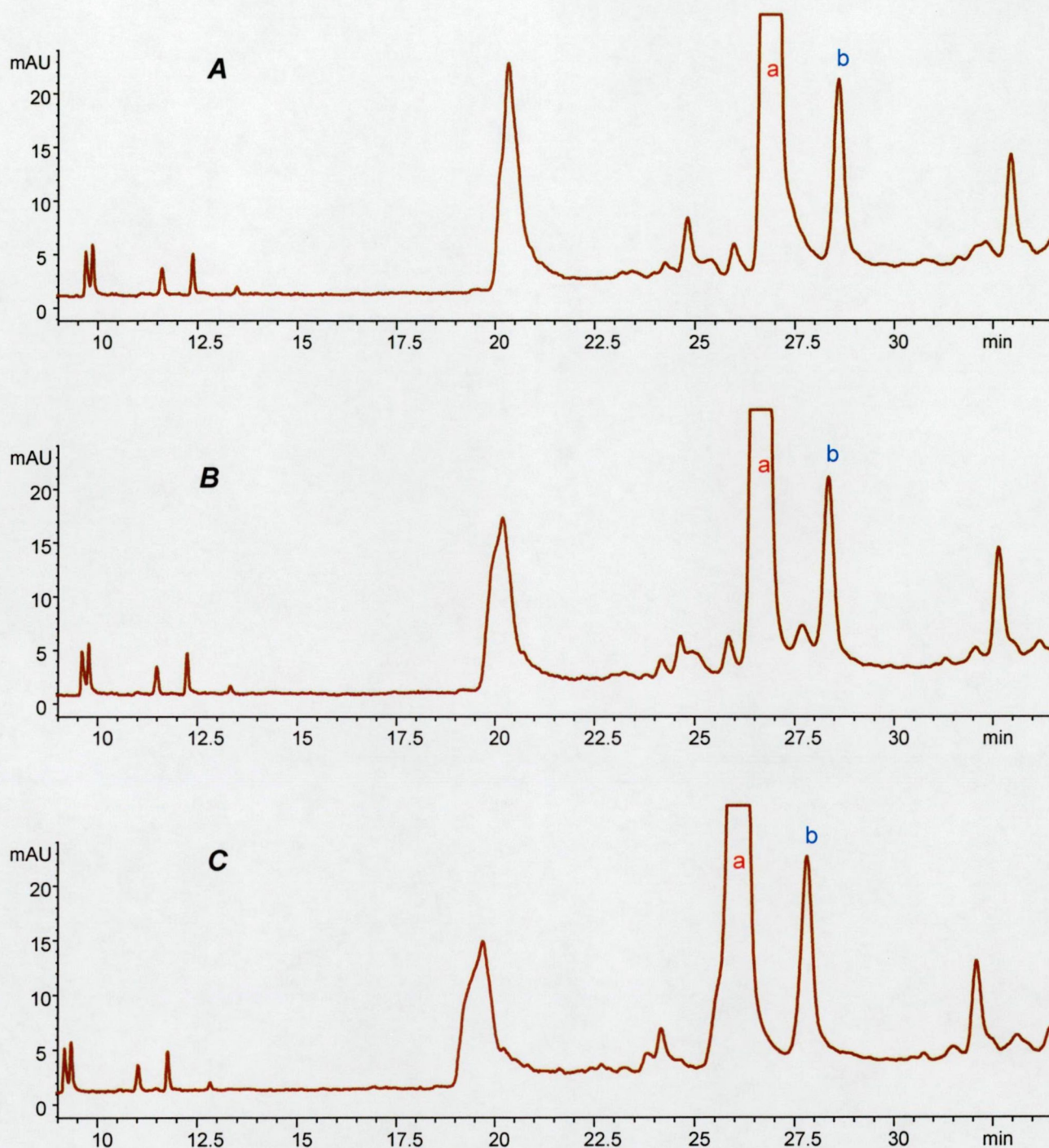
19. ábra. A pufferösszetétel hatása a DON és NIV sztenderdek CE elválasztására (a: DON, b: NIV; 50 mM, 100 mM borát puffer ill. 80mM borát puffer 20% MeOH tartalommal, 100 μ A; 22,7, 13,8 ill. 21,8 kV)

A 20. ábrán jól látható, hogy a két sztenderd komponens migrációs ideje és elválasztásának hatékonysága az áramerősség csökkentésével növekszik, ugyanakkor az érzékenységet csökkentő csúcs kiszélesedés is megfigyelhető.



20. ábra. Az áramerősség változtatásának a hatása a DON és NIV sztenderdek CE elválasztására 85 mM-os borát puffer koncentráció mellett (a: DON, b: NIV; 110 µA, 108 µA, 100 µA)

Már egy valódi mintán, azaz *Fusarium*-fertőzött búza extraktumon tanulmányoztuk a közvetlenül a minta elé a kapillárisba injektált eltérő nagyságú vízdugó elválasztásra gyakorolt hatását is. A 21/ A és B ábrán jól látható, hogy a DON csúcs leszálló ágában lévő komponens a 150 mbars injektált vízmennyiség hatására elvált, azaz a csúcscsúcs felbontás javult. A 21/ B és C ábrát megtekintve azonban azt is láthatjuk, hogy a DON csúcs felszálló ága előtt és leszálló ága után eluálódott komponens a további nagyobb vízdugó (300 mbars) hatására már a DON csúcsában jelenik meg, növelve annak alapvonal szélességét.

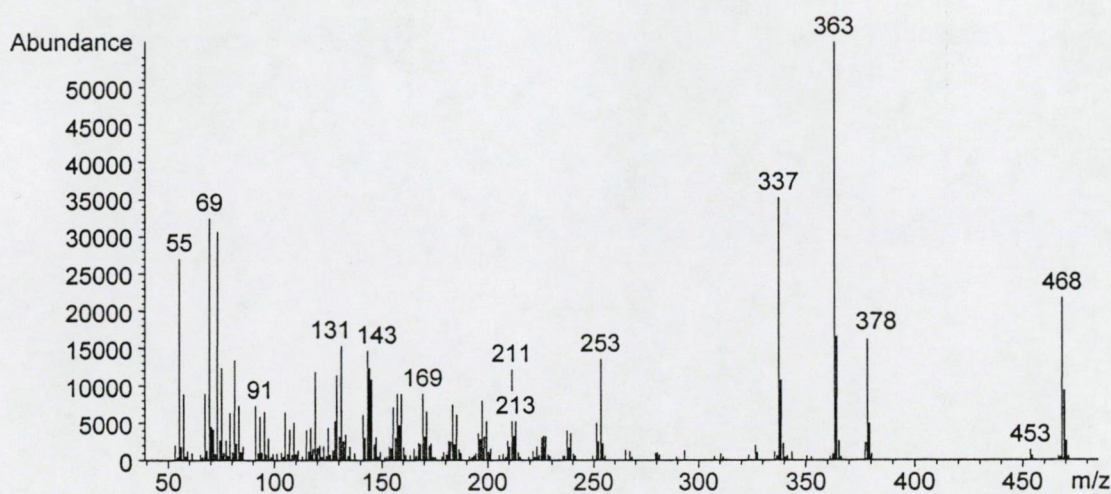


21. ábra. Közvetlenül a minta elé injektált, eltérő nagyságú vízdugó (stacking) hatása az ionok migrációjára (A: 0 mbars, B: 150 mbars, C: 300 mbars injektált víz mennyiség; a: DON, b: NIV; 100 mM borát puffer, 105 μ A, 14,0 kV).

Az 1200 μm optikai úthosszal rendelkező átfolyó UV detektor cella alkalmazásával - amelyhez a szeparációs kapilláris szinte holtterfogot nélkül csatlakoztatható - a detektálás érzékenysége is igen jelentős volt. A DON és NIV kimutathatósági határa 4/1-es jel/zaj viszony mellett 2 ill. 5 pg-nak bizonyult. Ezen jelentős detektálási érzékenység következtében a nyers ACN / H_2O (84/16 v/v) búza őrlemény extraktumokból SPE extrakció és koncentráció nélkül is sikerült a DON és NIV mátrix komponensektől történő elválasztását és érzékeny (350 ill. 875 $\mu\text{g/kg}$) kvantitatív meghatározását megoldanunk. SPE extrakciót is alkalmazva a módszer érzékenysége 70 ill. 175 $\mu\text{g/kg}$ -ra volt növelhető. A *Fusarium* mikotoxinok CE meghatározásával párhuzamosan sikerült, a kalapos gombák csoportjába sorolandó gyilkos galóca (*Amanita phalloides* L.) által szintetizált rendkívül veszélyes toxinok (α és β amanitin, phalloidin, phallacidin) kimutatására is új módszert kidolgoznunk (Komoróczy et al. 1999).

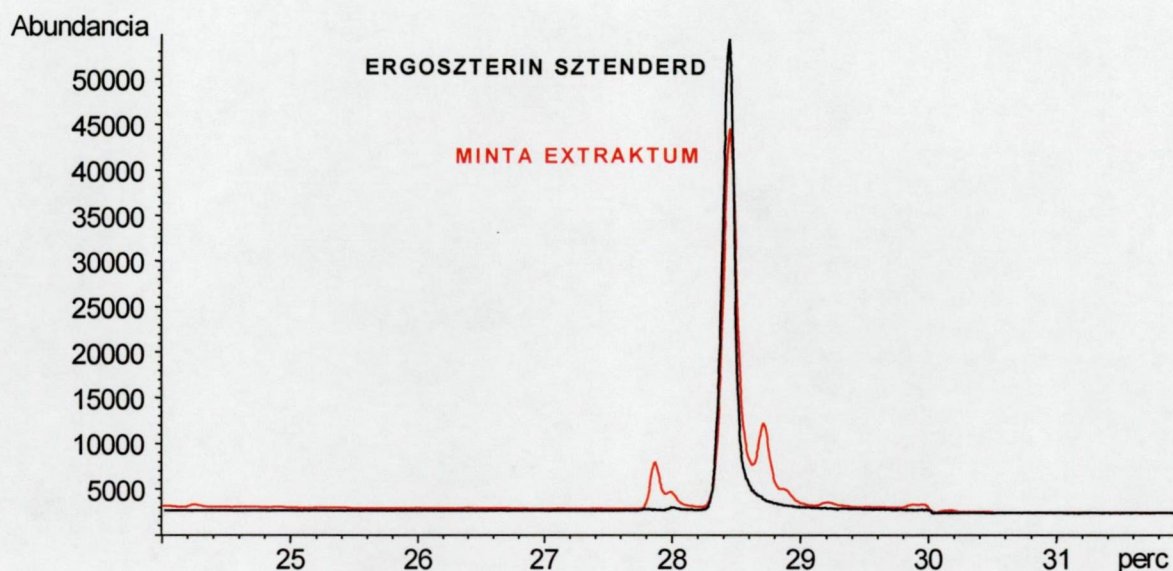
3.4. A *Fusarium* fertőzött búzaszemek ergoszterin és DON tartalmának, valamint szemfertőzöttségének vizsgálata és a közöttük lévő korrelációk

A búzaszem őrlemények ergoszterin tartalmának GC/MS (EI, SIM) technikával történő meghatározását az ergoszterin sztenderd GC/MS (EI, SCAN) analízise előzte meg, így lehetőségünk volt a karakterisztikus molekula (m/z 468) és fragmens ionok (m/z 337, 363) kiválasztására (22. ábra).



22. ábra. Az ergoszterin MS (EI) spektruma

A 23. ábrán egy ergoszterin sztenderd és egy minta extraktum GC/MS (EI, SIM) kromatogramja látható.

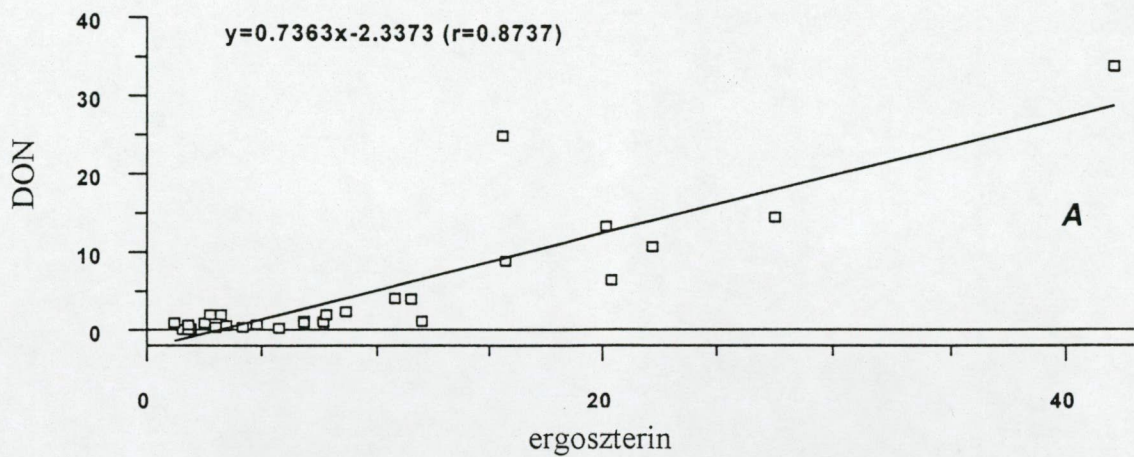


23. ábra. Ergoszterin sztenderd és mintaextrakt GC/MS (EI, SIM) kromatogramja

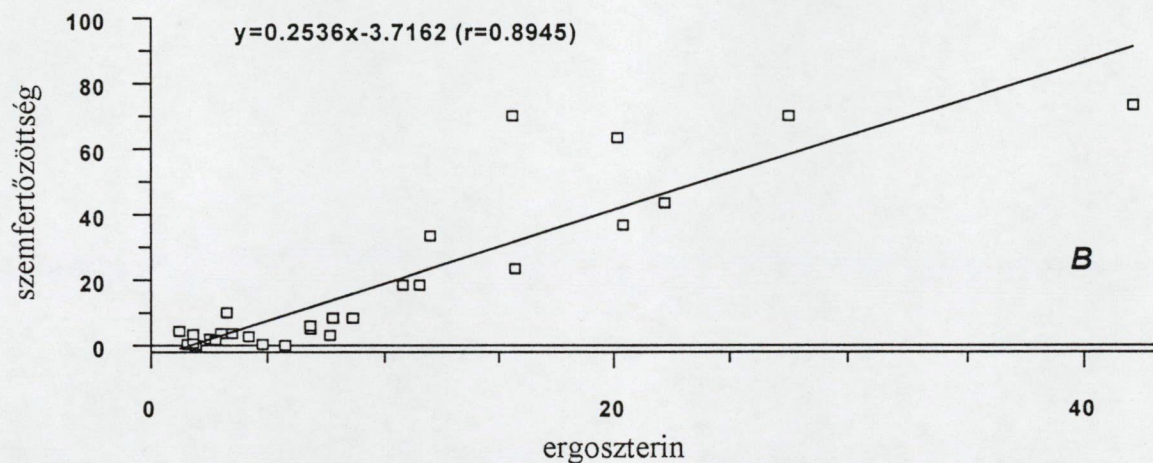
Vizsgálataink során négy, *Fusarium*okkal szemben eltérő rezisztenciával rendelkező búzafajtát mesterségesen fertőztünk, eltérő patogenitású *Fusarium* izolátumokkal (*F. graminearum*, *F. culmorum*), majd a búza betakarítását követően a kalász- és szemfertőzöttséget vizuálisan (Mesterházy 1999), míg a DON (2.3. fejezet) és ergoszterin (2.4. fejezet) koncentrációját az előzőekben már közölt műszeres analitikai módszerrel határoztuk meg. A kutatómunkám során vizsgált három paraméter közötti összefüggés vizsgálatának oka a gomba biomassza és ezen keresztül a toxintartalom előrejelzését (predikció) szolgáló analitikai eljárás kidolgozása az ergoszterin tartalom alapján. A mérési eredmények birtokában (21. táblázat) összefüggést kerestünk a szemfertőzöttség, a DON és az ergoszterin tartalom között. (24/ A, B, C ábra). A relatíve magas korrelációs koefficiens értékek ($r = 0,8737, 0,8945, 0,8981$) alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az ergoszterin kvantitatív meghatározása rendkívül érzékeny indikátora a gomba fertőzöttség mértékének, melynek ismeretében predikciót tudunk tenni a keletkezett mikotoxin (DON) mennyiségére is (Lamper et al. 2000).

<i>búza genotípus</i>	<i>Fusarium izolátum</i>	<i>szemfertőzöttség (%)</i>	<i>menyiség (mg/kg)</i>	
			<i>DON</i>	<i>ergoszterin</i>
<i>GK BENCE</i>	F.g. 40	18,33	3,92	11,53
	F.g. 12377	3,67	0,53	3,48
	F.g. 223	36,67	6,34	20,41
	F.c. 12375	23,33	8,79	15,73
	F.c. 207	43,33	10,63	22,21
	F.c. 12551	0,67	0,00	1,80
	F.c. 39.01	2,67	0,31	4,20
<i>RINGÓ SZTÁR</i>	F.g. 40	33,33	1,07	12,01
	F.g. 12377	8,33	1,93	7,80
	F.g. 223	18,33	3,98	10,80
	F.c. 12375	8,33	2,30	8,64
	F.c. 207	5,00	1,07	6,84
	F.c. 12551	0,33	0,65	4,80
	F.c. 39.01	0,00	0,18	5,76
<i>GK SÁGVÁRI- NOBEOKA BOZU x GK MINI MANÓ- SUMEY-3</i>	F.g. 40	3,00	0,99	7,68
	F.g. 12377	2,00	0,85	2,52
	F.g. 223	4,33	0,87	1,20
	F.c. 12375	1,67	1,90	2,76
	F.c. 207	10,00	1,92	3,24
	F.c. 12551	0,33	0,00	1,56
	F.c. 39.01	0,00	0,08	1,92
<i>GK ZOMBOR</i>	F.g. 40	70,00	24,86	15,61
	F.g. 12377	3,33	0,58	1,80
	F.g. 223	70,00	14,36	27,49
	F.c. 12375	73,33	33,71	42,14
	F.c. 207	63,33	13,22	20,17
	F.c. 12551	3,67	0,30	3,00
	F.c. 39.01	6,00	0,91	6,84

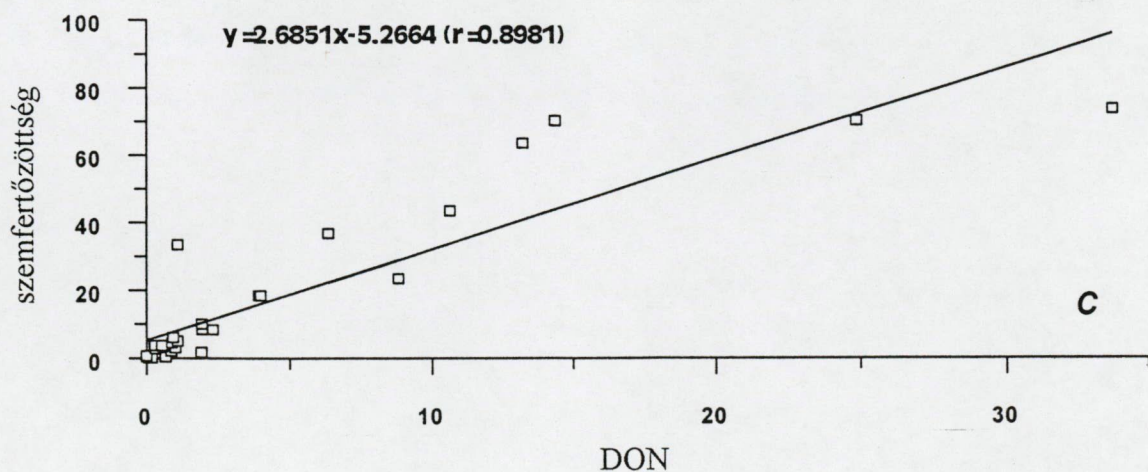
21. táblázat. A *Fusarium* fertőzött gabonaszemek szemfertőzöttség, DON és ergoszterin mérési eredményeinek összefoglaló táblázata



24/A. ábra. A DON (mg/kg) és az ergoszterin (mg/kg) tartalom közötti korreláció



24/B. ábra. A szemfertőzőtség (%) és ergoszterin tartalom (mg/kg) közötti korreláció



24/C. ábra. A szemfertőzőtség (%) és a DON (mg/kg) tartalom közötti korreláció

3.5. Fertőzött búzaminták ergoszterin tartalom alapján történő minőségi besorolása

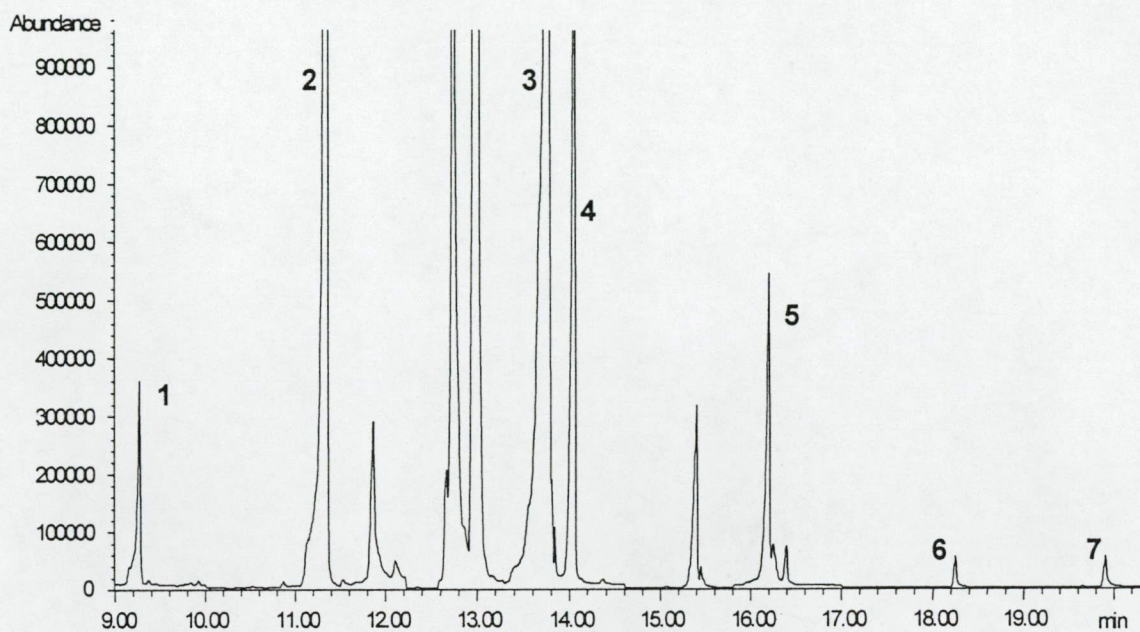
A továbbiakban az általunk szorosnak talált összefüggés alapján, a kísérletbe bevont búzafajták ergoszterin tartalmából meghatározható minőségi kategóriákba sorolás gyakorlati bevezetési lehetőségeit vizsgáltuk (Schnürer 1995). A Schnürer által kidolgozott minőségi kategóriák megfelelőségét a DON és a szemfertőzöttség értékek hozzárendelésével kívántam igazolni. Tekintettel arra, hogy a szemfertőzöttség és a toxin tartalom közötti szoros kapcsolat csak néhány esetben vitatható, ezért a kísérleteink során meghatározott paraméterek párhuzamba állításának elvi akadálya nincsen. Adataink alapján a GC/MS módszerrel meghatározott ergoszterin tartalmak rendkívül jól korrelálnak a vizuálisan megállapított szemfertőzöttség értékekkel és a DON tartalommal is. A mérési eredmények alapján a vizsgálatba bevont búzafajták kb. 42 %-a élelmiszeripari feldolgozásra, relatíve nagy hányada pedig takarmányozási célokra hasznosítható. Néhány minta esetében a rendkívül magas ergoszterin szint előrejelezte a várható mikotoxin szennyezettség mértékét is, melyet az összefoglaló táblázatban feltüntetett értékek is tanúsítanak. Azon búzafajtákat, ahol az ergoszterin tartalom meghaladta a 20 µg/g határértéket, a fokozott közegészségügyi veszély miatt továbbfeldolgozásra alkalmatlannak kellett ítélnünk (22. táblázat). A 21. táblázatban szereplő *F. culmorum* 12551 izolátummal fertőzött GK Bence illetve a GK Ságvári-Nobeoka Bozu x GK Mini Manó-Sumey-3 genotípusok esetében látható, hogy a DON RP-HPLC meghatározása során a mikotoxin nem volt kimutatható - a kimutathatósági határérték alatti koncentráció- ugyanakkor a GC/MS módszer érzékenységének köszönhetően az ergoszterin tartalom már utalást ad a fertőzöttség jelenlétére. Mindezek figyelembevételével az ergoszterin tartalom meghatározásán alapuló minőségi rendszerek gyakorlati életben történő hasznosítását megalapozottnak látjuk, és úgy ítéljük meg, hogy a HACCP rendszerek kiépítésekor kulcsszerepet játszó alapanyag minősítés szempontjából elengedhetetlen szerepet kaphat. Az EU elvárások teljesítése érdekében - ahol az export termékek toxinmentességét ill. a célország által előírt mikotoxin határértékek betartását igazolni kell - a módszer szabványosítási lehetősége is felmerülhet.

Minőségi szintek az ergoszterin tartalom alapján (µg/g szárazanyag)	Búza fajták	Fusarium izolátum No.
élelmiszer minőség < 5	GK Bence	F.g. 12377 F.c. 12551 F.c. 39.01
	Ringó Sztár	F.c. 12551
	GK Ságvári-Nobeoka Bozu / GK Mini Manó-Sumey 3	F.g. 12377 F.g. 223 F.c. 12375 F.c. 207 F.c. 12551 F.c. 39.01
	GK Zombor	F.g. 12377 F.c. 12551
takarmány minőség 5-10	Ringó Sztár	F.g. 12377 F.c. 12375 F.c. 207 F.c. 39.01
	GK Ságvári-Nobeoka Bozu x GK Mini Manó-Sumey 3	F.c. 40
	GK Zombor	F.c. 39.01
kötelező multitoxin analízis 10-20	GK Bence	F.g. 40 F.c. 12375
	Ringó Sztár	F.g. 40 F.g. 223
	GK Zombor	F.g. 40
tüzelőanyag minőség > 20	GK Bence	F.g. 223 F.c. 207
	GK Zombor	F.g. 223 F.c. 12375 F.c. 207

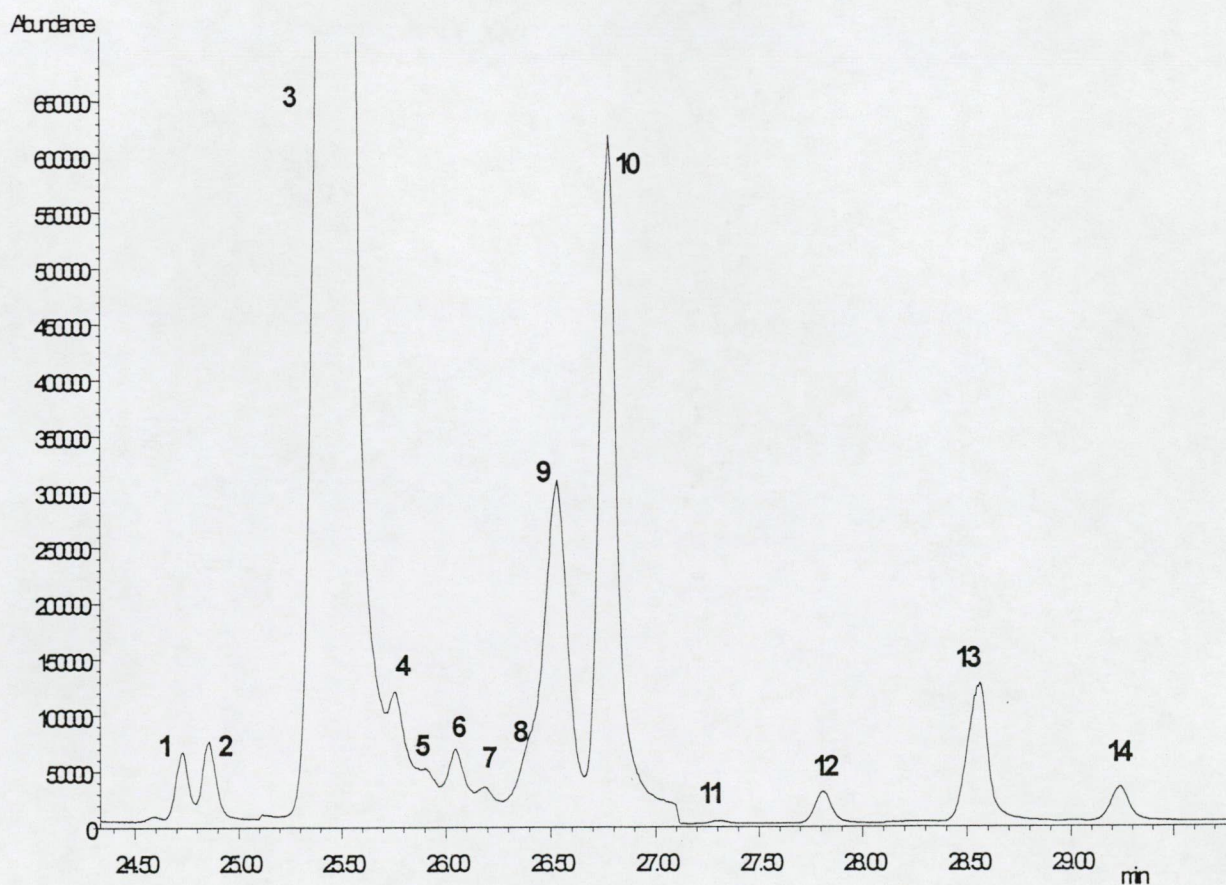
22. táblázat. A vizsgált búzaminták ergoszterin szint alapján történő, Schnürer (1995) szerinti minőségi besorolása

3.6. Különböző *Fusarium* fajok és izolátumok szteroid és zsírsav profilja

A fertőzött búzaszemek ergoszterin tartalmának HPLC eljárással történt vizsgálatára irányuló előkísérleteink során a kromatogramok egyértelműen igazolták azt a feltevésünket, hogy az ergoszterin illetve az ergoszterinhez hasonló kémiai szerkezetű, egyéb szteránvázis vegyületek számos esetben nem válnak el egymástól, így az eredmények kvantitatív kiértékelése akadályokba ütközik. A HPLC elválasztással nem érhető el a kellő felbontás sőt érzéketlenebb a GC-MS-nél, így GC/MS eljárással határoztuk meg a fertőzött búzaminták ergoszterin tartalmát. A GC/MS kromatogramok kiértékelése során megfigyeltük azt, hogy az ergoszterin mellett számos, a gomba által szintetizált szteránvázis vegyület van jelen a mintamátrixban. Az extrahálási módszer lehetővé tette a szteroidok mellett a zsírsavak feltárását is, így a mesterséges fertőzéséhez leggyakrabban alkalmazott *Fusarium* izolátumok teljes zsírsav illetve szteroid profiljának felvételét tűztük célul (25, 26. ábra). A mérési eredmények kiértékelése során megállapítottam, hogy in vitro tenyészetekben (szintetikus táptalajon) a legfontosabb *Fusarium* fajok esetében a domináns szteroid az ergoszterin (27. ábra 3. jelű), amely a törzsek döntő többségében az össz-szterin tartalom több mint 50 % -át teszi ki. Eltérő szteroid profilt mutat az *F.c.* 223 izolátum, ahol a domináns szteroid az ergoszte 7,24(28)-dienol (10 jelű), az ergoszterin nem éri el az össz-szteroid 40 %-át (27. ábra). Összehasonlítva a többi *F. culmorum* és *F. graminearum* izolátummal a micélium száraz tömegre vonatkoztatott ergoszterin mennyisége is csak a fele a többiéhez viszonyítva (23. táblázat). Ez felveti annak a veszélyét, hogy a predikció során a búzában mért ergoszterin mennyiségből alábecsüljük a várható DON kontaminációt, ezzel párhuzamosan a toxikológiai veszélyességet. Ezért ellenőriztem a *F. culmorum* 223 izolátummal fertőzött 4 búzafajta esetében (21. táblázat) a vizsgált paramétereket. Megállapítottam, hogy mind a DON tartalom (24/ A ábra), mind a szemfertőzöttség (24/ B ábra) szoros korrelációt mutat a mért ergoszterin értékekkel, így az általam kidolgozott prediktív modell a gyakorlatban is megfelelő biztonsággal használható.



25. ábra. A *Fusarium graminearum* 40 -es izolátum GC/MS zsírsav profilja
(1-7 számok lásd 24. táblázat)



26. ábra. A *Fusarium graminearum* 40 -es izolátum GC/MS szterol profilja
(1-14 számok lásd 23. táblázat)

<i>Fusarium</i> fajok	szteroid csúcsok száma													
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
DISCOLOR SZEKCIÓ														
F.culmorum 223	0,1875	0,1871	4,8420	0,6220	0,0103	0,1045	0,5108	0,0000	0,3731	5,2337	0,0046	0,0637	0,2952	0,0554
%	1,5016	1,4981	38,7671	4,9797	0,0827	0,8370	4,0897	0,0000	2,9874	41,9032	0,0368	0,5101	2,3634	0,4432
F. culmorum 12375	0,0951	0,1609	11,9975	0,3567	0,0101	0,0347	0,3684	0,0898	0,2136	2,4093	0,0097	0,0278	0,1089	0,0175
%	0,5983	1,0118	75,4557	2,2432	0,0637	0,2185	2,3168	0,5650	1,3433	15,1529	0,0611	0,1746	0,6852	0,1099
F.culmorum 89.4	0,1172	0,1272	15,2981	0,1835	0,0113	0,0366	0,1628	0,2265	0,4817	3,2351	0,0189	0,0410	0,1035	0,0266
%	0,5841	0,6338	76,2235	0,9142	0,0564	0,1825	0,8111	1,1286	2,3999	16,1191	0,0941	0,2040	0,5159	0,1327
F. culmorum 12551	0,0979	0,0669	9,2026	0,1725	0,0064	0,0367	0,3848	0,1638	0,2017	3,0574	0,0113	0,0441	0,0806	0,0331
%	0,7221	0,4935	67,8660	1,2720	0,0473	0,2710	2,8377	1,2078	1,4878	22,5472	0,0836	0,3251	0,5945	0,2444
F. graminearum 40	0,1034	0,1874	10,7989	0,1389	0,0165	0,0822	0,0500	0,2022	0,8524	2,6186	0,0039	0,0805	0,1476	0,0575
%	0,6741	1,2217	70,3971	0,9052	0,1076	0,5356	0,3260	1,3183	5,5565	17,0704	0,0255	0,5248	0,9620	0,3751
F. graminearum 207	0,1171	0,0737	10,4960	0,2444	0,0060	0,0538	0,4115	0,1615	0,2488	4,0637	0,0114	0,0609	0,1144	0,0470
%	0,7266	0,4578	65,1519	1,5168	0,0370	0,3340	2,5540	1,0023	1,5443	25,2249	0,0706	0,3781	0,7100	0,2916
F. graminearum 12377	0,1304	0,1524	13,8027	0,1749	0,0139	0,0374	0,0796	0,3137	0,6283	2,7539	0,0291	0,0431	0,0860	0,0245
%	0,7140	0,8340	75,5483	0,9572	0,0761	0,2050	0,4357	1,7172	3,4392	15,0735	0,1593	0,2358	0,4708	0,1340
F. graminearum 44	0,1144	0,2480	13,4976	0,1466	0,0198	0,0564	0,0587	0,1598	0,6691	1,9870	0,0054	0,0742	0,1816	0,0615
%	0,6618	1,4354	78,1111	0,8486	0,1144	0,3263	0,3398	0,9248	3,8720	11,4987	0,0310	0,4292	1,0511	0,3559
F. crookwellense	0,0316	0,0729	10,8012	0,0622	0,0086	0,0121	0,0468	0,1720	0,3070	0,9380	0,0171	0,0171	0,0351	0,0082
%	0,2524	0,5819	86,2030	0,4961	0,0689	0,0963	0,3735	1,3723	2,4501	7,4863	0,1365	0,1365	0,2805	0,0657
F. sulphureum	0,0058	0,0200	0,8948	0,0024	0,0020	0,0010	0,0016	0,0141	0,0474	0,0839	0,0069	0,0015	0,0072	0,0013
%	0,5314	1,8324	82,0949	0,2196	0,1877	0,0903	0,1463	1,2954	4,3527	7,7008	0,6371	0,1364	0,6581	0,1171

SPOROTRICHIELLA SZEKCIÓ														
F. sporotrichioides	0,0155	0,0151	2,1988	0,0178	0,0018	0,0057	0,0300	0,0490	0,0806	0,5942	0,0029	0,0098	0,0119	0,0067
%	0,5113	0,4974	72,3300	0,5870	0,0577	0,1886	0,9880	1,6124	2,6518	19,5461	0,0950	0,3208	0,3920	0,2217
F. tricinctum	0,4370	0,3566	17,5975	0,1562	0,0315	0,1329	0,3441	0,9057	1,5875	8,2905	0,0263	0,0319	0,0765	0,0159
%	1,4572	1,1889	58,6778	0,5207	0,1050	0,4433	1,1472	3,0200	5,2934	27,6441	0,0878	0,1064	0,2551	0,0530
F. poae	0,0008	0,0200	1,1014	0,0146	0,0022	0,0024	0,0206	0,0202	0,0207	0,1609	0,0059	0,0008	0,0090	0,0006
%	0,0604	1,4469	79,8110	1,0553	0,1591	0,1726	1,4892	1,4636	1,4992	11,6610	0,4308	0,0592	0,6492	0,0425
LISEOLA SZEKCIÓ														
F. moniliforme	0,0293	0,0564	7,3977	0,0194	0,0035	0,0026	0,0338	0,0893	0,1152	0,3134	0,0172	0,0078	0,0907	0,0037
%	0,3588	0,6895	90,4362	0,2374	0,0429	0,0319	0,4128	1,0916	1,4084	3,8316	0,2101	0,0948	1,1088	0,0452
F. nygamay	0,1369	0,0847	15,8972	0,0716	0,0089	0,0226	0,0707	0,1027	0,2862	1,2168	0,0092	0,0192	0,0464	0,0069
%	0,7615	0,4708	88,4161	0,3985	0,0494	0,1254	0,3930	0,5709	1,5919	6,7676	0,0514	0,1069	0,2579	0,0386

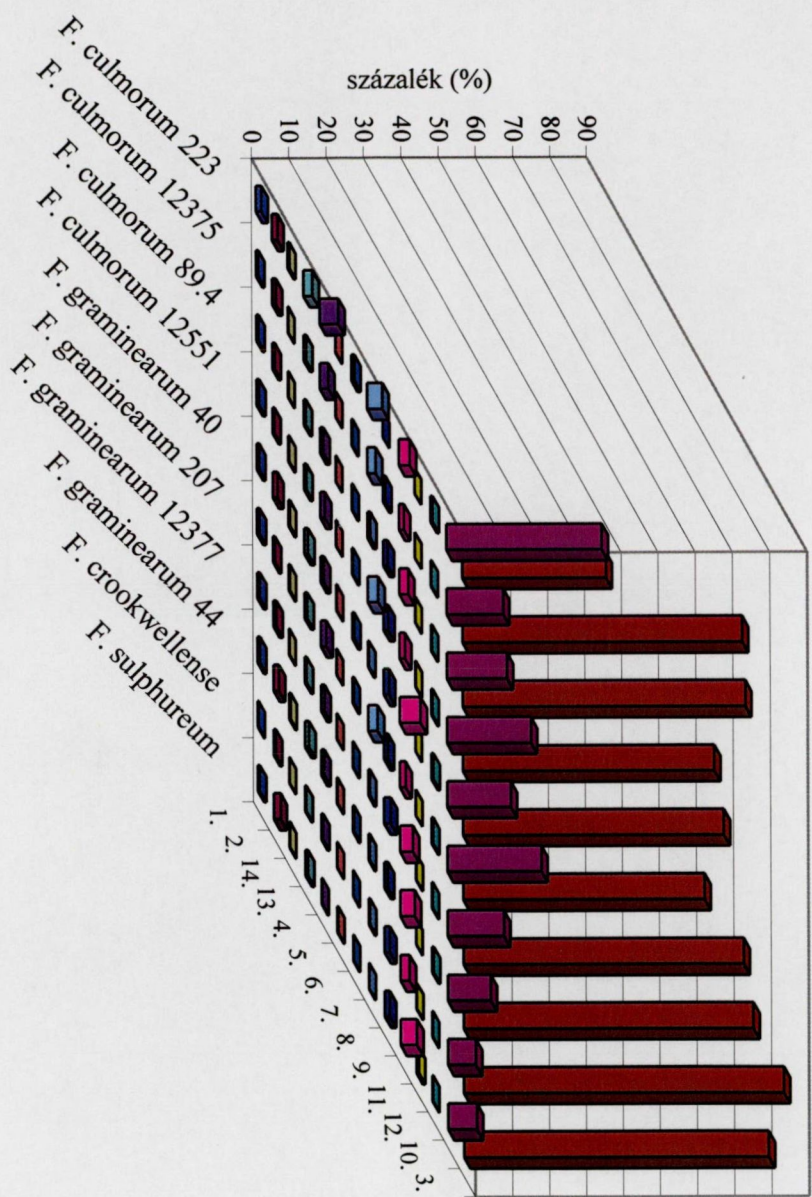
- 1.,2., 4.,6., 7., 8., 14-es számmal jelölt szteroidok csúcsok nincsenek még azonosítva
3. csúcs: C₂₈ Δ^{5,7,22} trién-3β-ol (ergoszterin); 24-methyl cholesta-5,7,22-trienol
5. csúcs: C₂₈ Δ^{7,22} dién-3β-ol; 24-methyl cholesta-7,22-dienol; ergosta-7,22 dién-3 -βol
9. csúcs: C₂₈ Δ^{5,7} dién-3β-ol; 24-methyl cholesta-5,7-dienol; ergosta 5,7-dienol
10. csúcs: C₂₈ Δ^{7,24(28)} dién-3β-ol, ;24-methyl cholesta-7,24(28)-dienol; ergosta 7,24(28)-dienol
11. csúcs: C₃₀ Δ^{8,24} dién-3β-ol; 8,24-lovasztadién-3β-ol; lovast-8,24-dienol
12. csúcs: C₂₉ Δ^{7,24(28)} dién-3β-ol; 4 α-methylergosta-7,24(28)-dién-3β-ol
13. csúcs: C₃₁ Δ^{8,24(28)} dién-3β-ol; 24-methylenelanost-8-én-3β-ol; 24 (28)-methylene-24,25 dihydrolovasterol

23. táblázat. A kísérletsorozatba bevont *Fusarium* fajok szteroid összetétele (ng/g micélium szárastömeg ill %)

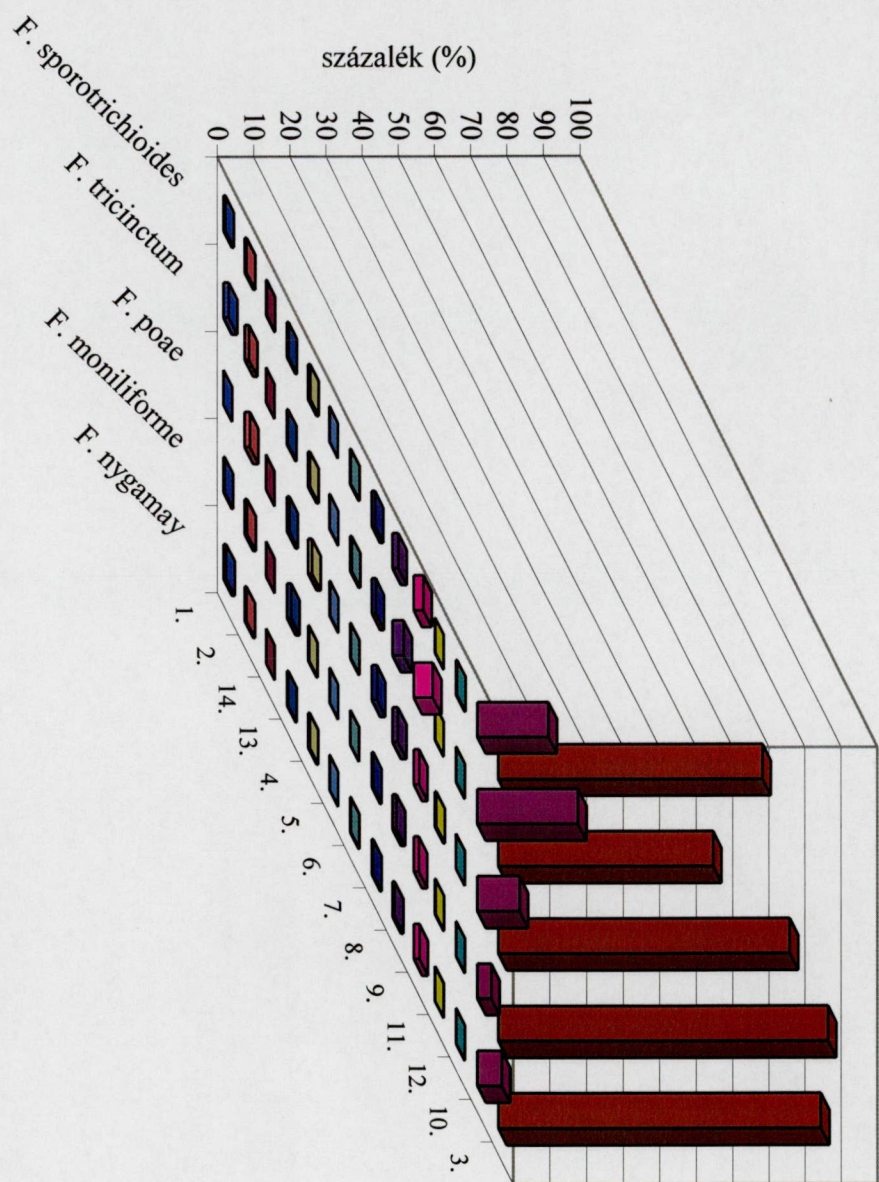
Ha rendszertanilag csoportosítjuk a *Fusariumokat* (Nirenberg 1989) és ennek függvényében ábrázoljuk a termelt szteroidokat (28, 29. ábra) elmondhatjuk, hogy a szteroid profilok egyértelműen nem alkalmazhatók kemotaxonómiai differenciálásra a *Fusarium* nemzetségen belül. Ha azonban összehasonlítjuk a nemzetség szteroid profilját pl. az ochratoxin termelő *Aspergillusokéval* (Varga et al. 2001/a,b), ahol az ergoszterin mellett a minor szteroidok hiányoznak, így ezek jelenléte természetes mintákban *Fusarium* szennyezettséget valószínűsít. Ehhez azonban további szántóföldi (preharvest) és raktári (postharvest) fonalgomba nemzetségek (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*) szteroid profiljának felvétele is szükséges. A 23. táblázatban feltüntetett minor szteroid komponensek azonosítása és fertőzött gabona mintákból való kimutatása a jövő fontos feladata, mivel a növénytermesztésben alkalmazott fungicidek jelentős része a patogén gombák szteroid bioszintézisét gátolja (Tiemann et al. 1997).

A vizsgált *Fusarium* fajok zsírsav profilját a 24. táblázat mutatja be. Ha kemotaxonomiailag értékeljük a zsírsav profilokat, elmondhatjuk, hogy a *Discolor* szekción belül a *F. culmorum* és az *F. graminearum* izolátumok egységes, míg a *F. crookwellense* és a *F. sulphureum* erősen eltérő képet mutatnak (30. ábra). Az utóbbi 2 fajról azonban a taxonómusok véleménye sem egységes (Nirenberg 1989). Az egyéb *Fusariumok* zsírsav profilját tekintve a *Sporotrichiella* és *Liseola* szekció egyes tagjai között szintén lényeges eltérések tapasztalhatók (31. ábra).

Jelentős különbség mutatkozik viszont az ochratoxin termelő *Aspergillusok* és a vizsgált *Fusariumok* között (Varga et al. 2001/a,b). Egyrészt a micélium száraz tömegre vonatkoztatott össz zsírsav mennyisége a *Fusarium* nemzetség tagjainál 10-15-szörös az *Aspergillusokhoz* viszonyítva, másrészt a vizsgált *Aspergillusok* nem termelnek ejkozán-(C20:0) és dokozánsavat (C22:0). Hasonlóan a szteroidokhoz, további gombanemzetségek vizsgálata is szükséges a jövőben az általam kidolgozott módszerrel, mivel a kemotaxonómiában még nem alakultak ki egységes módszerek, így a szterin és zsírsav profilok összevetése más irodalmi adatokkal nehézségekbe ütközik (Paterson 1996, Kock et al. 1996).



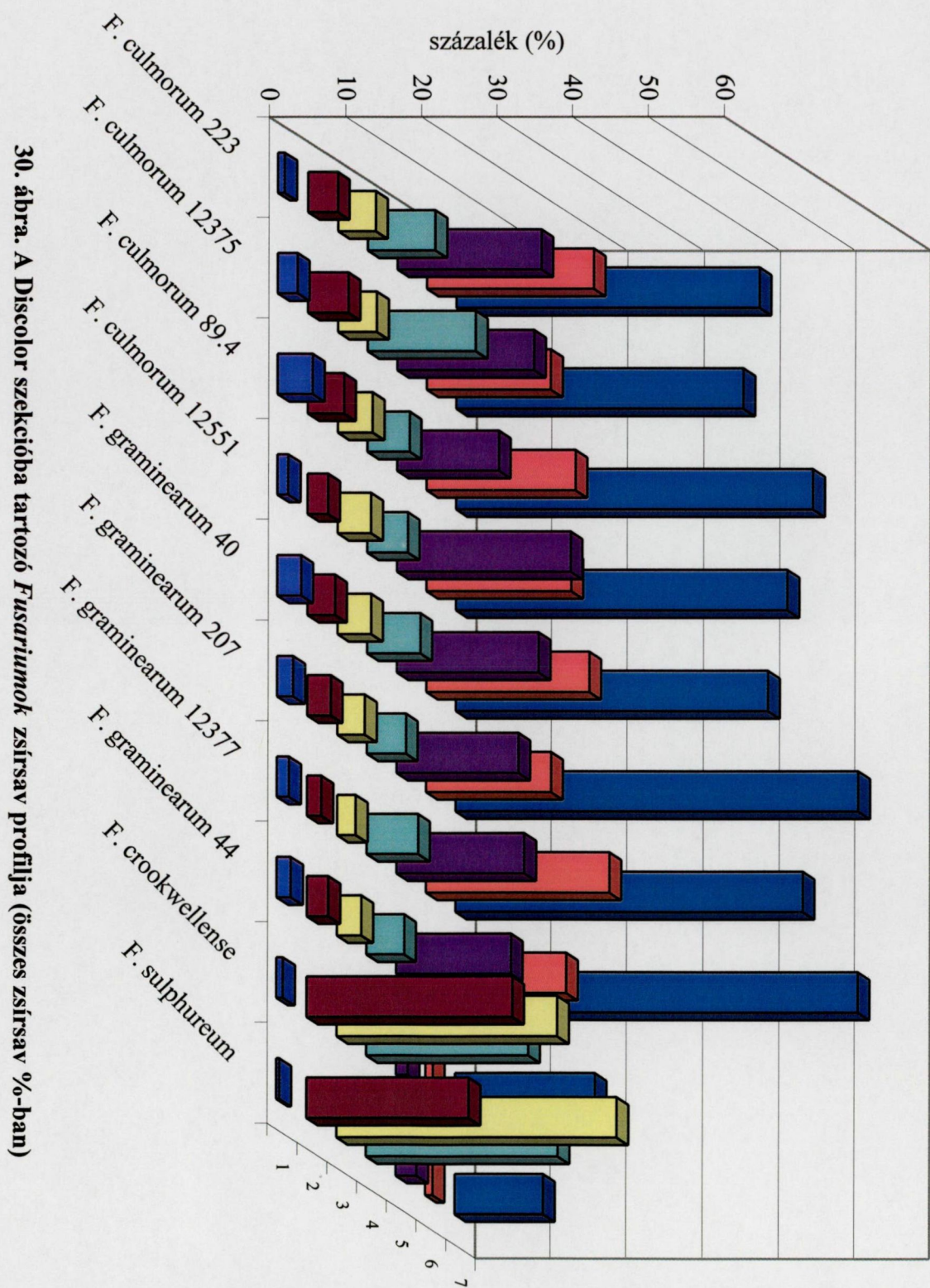
28. ábra. A *Discolor* szekciába tartozó *Fusariumok* szteroid profilja (összes szterol %-ban)



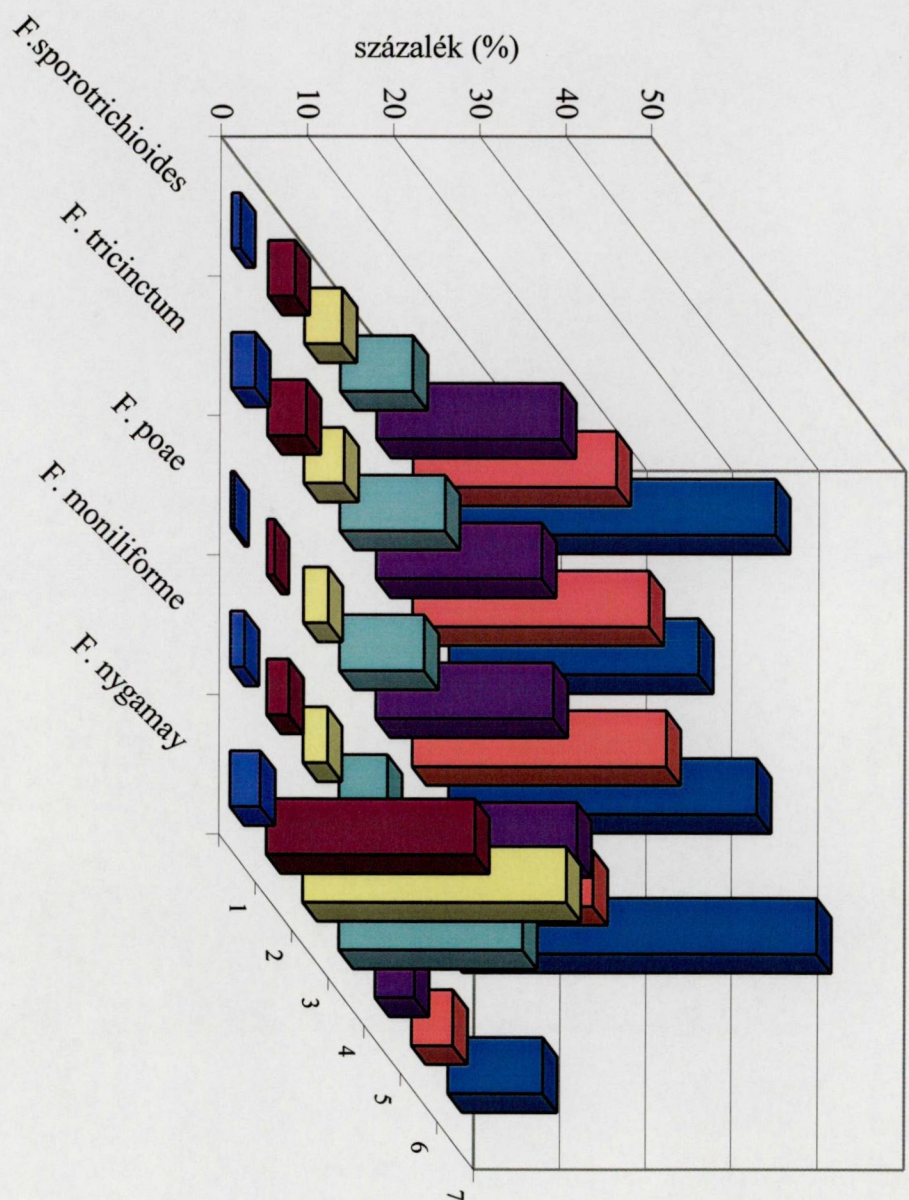
29. ábra. Egyéb *Fusariumok* szteroid profilja (összes szterol %-ban)

<i>Fusarium</i> fajok	1.tetradekánsav (C14:0)		2. hexadekánsav (C16:0)		3. olajsav (C18:1)		4. oktadekánsav (C18:0)		5. ejkozánsav (C20:0)		6. dokozánsav (C22:0)		7. tetrakozánsav (C24:0)		összes zsírsav
	ng/g	%	ng/g	%	ng/g	%	ng/g	%	%	ng/g	%	ng/g	%	ng/g	ng/g
DISCOLOR SZEKCIÓ															
<i>F. culmorum</i> 223	161,3	0,88	4079,4	22,16	7363,5	40,00	3523,3	8,94	19,14	916,6	4,98	716,9	3,89	1645,5	18406,5
<i>F. culmorum</i> 12375	254,2	2,55	1648,4	16,51	3785,7	37,93	1816	14,33	18,19	513,4	5,14	533,1	5,34	1430,5	9981,3
<i>F. culmorum</i> 89.4	257,7	4,57	1117,9	19,81	2659,5	47,13	763,8	5,58	13,54	260	4,61	269	4,77	314,8	5642,7
<i>F. culmorum</i> 12551	273,5	1,41	3725,9	19,26	8464,8	43,76	4466	5,36	23,09	856,8	4,43	519,4	2,69	1037,4	19343,8
<i>F. graminearum</i> 40	733,8	3,10	5132,6	21,68	9761,1	41,22	4469,9	7,05	18,88	1053,4	4,45	857,2	3,62	1670,4	23687,4
<i>F. graminearum</i> 207	282,3	2,06	2283,3	16,63	7305,9	53,21	2226,4	5,15	16,21	502,7	3,66	423,7	3,09	706,9	13731,2
<i>F. graminearum</i> 12377	142,6	1,57	2219,0	24,39	4172,8	45,86	1547,9	6,80	17,01	226,5	2,49	171,4	1,88	619	9099,2
<i>F. graminearum</i> 44	273,6	1,83	2789,1	18,68	7940,9	53,18	2278,5	4,98	15,26	485,4	3,25	420,5	2,82	744,3	14932,3
<i>F. crookwellense</i>	17,3	0,85	554,1	27,23	595,4	29,26	437,4	18,61	21,50	32,0	1,57	19,9	0,98	378,7	2034,8
<i>F. sulphureum</i>	7,4	0,40	397,1	21,43	688,4	37,15	471,6	11,79	25,45	51,2	2,76	18,6	1,00	218,5	1852,8
SPOROTRICHIELLA SZEKCIÓ															
<i>F. sporotrichioides</i>	128,2	1,04	2906,2	23,65	4659,7	37,92	2630,9	8,40	21,41	543,1	4,42	386,8	3,15	1031,9	12286,8
<i>F. tricinctum</i>	364,8	2,80	3583,1	27,52	3784,8	29,07	2497,5	12,20	19,19	612,5	4,71	587,1	4,51	1588,1	13017,9
<i>F. poae</i>	7,1	0,41	510,1	29,56	619,1	35,88	354,9	9,80	20,57	50,0	2,90	15,3	0,89	169,2	1725,1
LISEOLA SZEKCIÓ															
<i>F. moniliforme</i>	259,5	1,66	3280,6	21,04	6680,5	42,84	3647,2	5,60	23,39	446,5	2,86	405,6	2,60	872,4	15592,3
<i>F. nygamay</i>	229,9	3,55	1567,4	24,18	1983,8	30,61	1381,5	10,98	21,32	295,1	4,55	311,5	4,81	711,7	6480,9

24. táblázat. A kísérletsorozatba bevont *Fusarium* fajok zsírsav összetétele



30. ábra. A *Discolor* szekcióba tartozó *Fusariumok* zsírsav profilja (összes zsírsav %-ban)



31. ábra. Egyéb *Fusarium*ok zsírsav profilja (összes zsírsav %-ban)

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az új évezred küszöbén a mezőgazdaság és ezen belül a növénytermesztés fontos új kihívások előtt áll, melyek megoldása alapvetően befolyásolja az élelmiszeripari termékek és takarmányok minőségét is. A növénytermesztés által szolgáltatott, továbbfeldolgozásra kerülő alapanyagok tekintetében a minőség és az egészségügyi biztonság a figyelem középpontjába került. Az élelmiszerek okozta élelmiszerfertőzések, mikotoxikózisok és ételmérgezések előfordulási gyakoriságának növekedése az élelmiszer előállítással kapcsolatban is a minőségbiztosítási rendszerek bevezetését tette szükségessé. A hatályos előírások értelmében (17/1999. (II.10.) FVM - EüM együttes rendelet) 2002. január 1.-vel minden élelmiszer előállító egység köteles a "Veszélyek Elemzése Kritikus Irányítási Pontok" (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point) rendszert (illetve annak egyes elemeit) működtetni.

A HACCP rendszer és vele összefüggésben a prediktív mikrobiológia és a kockázat becslés (RA, Risk Analysis) lehetővé teszi a mikrobiológiai veszélyek kiküszöbölését illetve a megengedett határértékek szintjére való csökkentését. A új rendszer a prevencióra helyezi a hangsúlyt, ezért a kizárólagos késztermék ellenőrzés helyébe a gyártási folyamat teljes egészének a felülvizsgálata került. A jelenleg alkalmazott mikrobiológiai vizsgálatok (pl. tenyésztési módszerek stb.) időigényességük miatt lassan szolgáltatnak eredményt, ezért a gyors, hatékony műszeres analitikai vizsgálatok szerepe, ahol a gombák és mikroorganizmusok okozta szennyezettségre egyes komponensek kimutatásával predikciót lehet tenni, egyre inkább nő.

A kalászos gabonafélék közül a búza egyik legfontosabb szántóföldi eredetű gombabetegsége a kalász- ill. a csőfuzariózis. A *Fusariumok* okozta megbetegedések eredményeképpen nemcsak a termésmennyiség és annak minősége csökken, hanem számolnunk kell a keletkezett mikotoxinok egészségkárosító hatásával is mind humán, mind állategészségügyi vonatkozásban. A Gabonatermesztési Kutató Kht kísérleti tenyészertjében végzett kutatómunkám során egyértelműen igazolódott, hogy a hazai környezeti feltételek mellett a legnagyobb veszélyt a *Fusarium graminearum* és *Fusarium culmorum* fertőzés okozza. Ezen *Fusarium* fajok másodlagos metabolitjai közül legnagyobb veszélyt a trichotecén-vázis mikotoxinok jelentik. Élettani hatásukat tekintve erős sejtmérgek, károsítják az ideg- és immunrendszert, valamint a parenchimas szerveket. A fertőzés során dezoxinivalenol (DON, vomitoxin) valamint a nivalenol (NIV) jelenléte a

meghatározó, de a több éves monitoring vizsgálatok a DON meghatározó szerepét bizonyították. A köztermesztésben lévő búza fajtasortiment *Fusariumokkal* szembeni rezisztenciája rendkívül eltérő, ezért a keletkezett mikotoxin mennyisége is tág határok között mozog (0,2-30 mg/kg). Az 1998-2000 között végrehajtott szántóföldi kísérleteink során különböző patogenitású *Fusarium* izolátumokkal fertőztünk eltérő *Fusarium* rezisztenciával rendelkező búzafajtákat. A *Fusariumok* okozta megbetegedés mértékét a vizuálisan megállapított szem- és kalászfertőzöttség, valamint az RP-HPLC technikával meghatározott DON tartalom alapján jellemeztük. A vizuálisan (bonitálás) megállapított szemfertőzöttségi értékek és a DON tartalom között rendkívül szoros korrelációt lehet kimutatni, ami a fertőzés mértékének objektív jellemzését teszi lehetővé. Annak érdekében, hogy a DON kvantitatív és kvalitatív meghatározása adott esetben a HACCP rendszerek alapelveihez és az EU konform elvárásokhoz is igazodni tudjon (gyors vizsgálati módszerek), egy rendkívül gyors RP-HPLC/UV eljárást dolgoztunk ki - beleértve a minta extrakció és mintatisztítás lépéseit (aktív szén, neutrális alumínium-oxid) is - mely a sorozatvizsgálatok kivitelezése szempontjából nélkülözhetetlen. Az általunk alkalmazott grádiens elúció segítségével a DON retenciós ideje 5,55 percre volt csökkenthető ($\lambda_{\max} = 218,5 \text{ nm}$).

A hatósági ellenőrzést végző műszercentrumokban, valamint a növény-nemesítéssel foglalkozó kutatóintézetekben, ahol az F1 generációkban rendkívül kis mintamennyiségek állnak rendelkezésre, a legkorszerűbb elválasztástechnikai eljárások, mint pl. a kapilláris elektroforézis (CE) kis mintaigénye (nanoliter) adta lehetőségeit is ki kell aknázni. Kutatómunkánk során a gabonafélékben leggyakrabban előforduló DON és NIV toxinok kvantitatív meghatározására a HPLC és GC eljárásoknál költségkímélőbb CE módszert dolgoztunk ki. A nyers búza őrlemény extraktumokból mintatisztítás és koncentráció nélkül is sikerült a DON és NIV mintamátrixtól történő elválasztását és rendkívül érzékeny (875 $\mu\text{g/kg}$) kvantitatív meghatározását megoldanunk. Szilárd fázisú extrakciót is alkalmazva a módszer érzékenysége 350 $\mu\text{g/kg}$ -ra volt csökkenthető. A módszerfejlesztés során a pufferösszetétel, az áramerősség, valamint az injektálási módszer elválasztásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az általunk kidolgozott mérési körülmények mellett a DON és NIV kimutathatósági határa 2 ill. 5 pg-nak bizonyult.

A HACCP rendszer és vele összefüggésben a prediktív mikrobiológia - potenciálisan veszélyes mikotoxinok monitorozása - különös jelentőséggel bír. A fonalas gombabiomassza mérésére szolgáló hagyományos módszerek többsége rendkívül

hosszadalmas és vegyszerigényes, így a prevenció kritériumai közül a gyorsaság alapelve nem valósul meg. A vizsgálataink és a szakirodalom alapján úgy tűnik, hogy az ergoszterin tartalom rendkívül érzékeny indikátora a gombafertőzöttség mértékének, aminek ismeretében a keletkezett mikotoxin mennyiségére is predikciót tudunk tenni. Az ergoszterin a gomba sejtmembránjában található szerves, szteránvázas vegyület, melynek rendkívül érzékeny, gyors, jól reprodukálható kvalitatív és kvantitatív meghatározására gázkromatográfiás és tömegspektrometriás (GC/MS) módszert dolgoztunk ki. A GC/MS technikával mért ergoszterin és az RP-HPLC módszerrel meghatározott DON tartalom közötti szoros korreláció azt bizonyította, hogy az ergoszterin tartalom alapján történő predikciót felhasználva egy adott búzatétel minősítését el lehet végezni. A Schnürer által javasolt, kizárólag ergoszterin tartalom alapján felállított minőségi kategóriák (élelmiszer, takarmány, kötelező mikotoxin monitoring, tüzelőanyag) helytállóságát a vizuálisan meghatározott szemfertőzöttség, a DON és az ergoszterin tartalom közötti összefüggésvizsgálattal kívántam igazolni. Mérési eredményeim szoros korrelációt mutattak a vizsgált három paraméter között, ami egyértelműen igazolja a minőségi kategóriák megfelelőségét. Az általunk igazolt minőségi rendszer a gabonafélék malmi átvételekor a tétel mikotoxin kontaminációjára is felvilágosítást ad, így a tétel továbbfeldolgozásáról és adott esetben elkülönítő raktározásáról is dönteni lehet. A gyors ergoszterin tartalom meghatározás alapján történő gomba biomassza előrejelzésére kidolgozott módszerünk - a francia szabványosításhoz hasonlóan - a hazai akkreditált vizsgálatok körét is bővítheti.

A különböző *Fusarium* fajokon elvégzett GC/MS vizsgálatok a zsírsavprofil alapján rokonsági kapcsolatokra vonatkozó következtetések levonását is lehetővé tették. A szteránvázas vegyületekre e tekintetben nem lehet támaszkodni, mert egyik *Fusarium* fajban sem találtunk fajspecifikus szteroidot, és a szteránvázas komponensek aránya sem differenciál megfelelően (27-29. ábra). Más a helyzet a zsírsavakkal. A *Discolor* szekcióba tartozó *F. graminearum* és *F. culmorum* tetrakozánsav/dokozánsav aránya jelentősen eltér a *Sporotrichiella* szekció fajaitól, de a szintén *Discolor* szekcióba sorolt *F. crookwellense* és *F. sulphureum* fajokéitól is. A *F. moniliforme* zsírsavspektruma eltér a *F. nygamay*-étől (*Liseola* szekció), viszont utóbbi zsírsavösszetétele rokonságot mutat a *F. sulphureum* (*Discolor* szekció) zsírsavösszetételével (30-31. ábra). Ezért valószínű, hogy egyes *Fusarium* fajok rendszertani besorolását felül kell vizsgálni.

4. CONCLUSION

At the doorstep of the new millennium, agriculture, and within it plant-growing, faces important new challenges, which basically affect the quality of the products of food industry and forage. In regard to raw materials supplied by plant-growing for further processing, quality and medical safety became into the focal point of attention. The increase in the frequency of food-infections, mycotoxicosis and food-poisoning necessitated the introduction of quality assurance systems in food-production as well. According to the effective regulations (Hygiene Decree 17/1999), all food producing businesses must operate the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system (or its certain elements) from 1 January 2002.

The HACCP system, in relation to it, predictive microbiology, and Risk Analysis enable us to avoid the microbiological hazards or to depreciate their level below the permissible limits. The new system lays stress on prevention, thus the exclusive finished-product control is replaced by the supervision of the whole production procedure. The existing microbiological tests (for example, the culturing methods, etc.) are time-consuming and slowly conduce to a result, thus the role of fast, effective instrumental analytical methods, by which contamination due to fungi and microorganisms can be predicted via detection of certain components, is increasing.

Considering cereals, one of the most important, field origin fungal diseases of wheat is the spike and kernel fusariosis. Due to the incidences caused by *Fusariums*, not only the quality and quantity of the crop decrease, but we must also face the harmful effect of the accumulated mycotoxins relating to both human and animal health. During my research work in the nursery of the Gabonatermesztési Kutató Kht (Cereal Research Non- Profit Co.), it was clearly proved that under the Hungarian environmental conditions, the highest hazard is caused by the *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* infection. Among the secondary metabolites of these *Fusarium* species, the mycotoxins with trichothecen structure represent the highest danger. Regarding their physiological effect, they are strong cell poisons, they damage the nervous and immune systems, and the parenchymatous organs. During the infection, a significant amount of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) and nivalenol (NIV) can be produced, but several years of monitoring proved that the DON has a determinative role. The resistance of cultivated wheats against *Fusariums* is remarkably diverse, therefore, the quantity of the generated mycotoxin greatly varies (0.2-

30 mg/kg). During our field experiments in 1998-2000, we infected different wheat cultivars of various resistances against *Fusariums* with *Fusarium* isolates of different pathogenicity. The disease severity caused by the *Fusariums* was characterized according to the rate of the visually detected grain and spike contamination, and to the DON content determined by RP-HPLC method. The visually detected grain-contamination values and the DON content appeared to have a very close correlation, which enables an objective assessment of the contamination level. In order to adjust the qualitative and quantitative determination of DON to the principles of HACCP systems and the EN requirements (fast examination methods), we worked out a very fast RP-HPLC/UV procedure, including the steps of extraction and cleaning of samples (active carbon, neutral aluminium-oxide), which is essential for carrying out serial examinations. By the applied gradient elution, it was possible to reduce the retention time of DON to 5.55 minutes ($\lambda_{\max} = 218,5 \text{ nm}$).

In the instrument centres performing authoritative inspections and in research institutes dealing with plant improvement, where only very small sample quantities are available in the F1 generations, the advantage given by the most modern separation techniques, like the capillary electrophoresis (CE), requiring small amount of samples (nanolitre) should be utilized. During my research work, a new CE method was developed for the quantitative determination of DON and NIV toxins (which most often occur in cereals) which is more cost-sparing than the HPLC and GC procedures. Using raw wheat meals extract, we managed to separate DON and NIV from the sample matrix and get a very sensitive (875 $\mu\text{g/kg}$) quantitative assessment even without cleaning and concentrating the sample. Applying solid-phase extraction, the sensitivity of the method could be reduced to 350 $\mu\text{g/kg}$. During the development of the method, we studied how the buffer composition, the current intensity, and the injection method affected the separation. Under our newly developed measurement conditions, the detectability limit of DON and NIV was 2 and 5 pg respectively.

The HACCP system, and in relation to it, predictive microbiology (monitoring potentially hazardous mycotoxins) have a significant role. Most of the traditional methods for measuring mycelial (fungus) biomass are extremely long and require a lot of chemicals, which means one of the requirements of prevention, the principle of fastness is not met. Based upon our examinations and the literature, it seems that the ergosterol content is a highly sensitive indicator of the fungus contamination, that enables us to predict the

quantity of the generated mycotoxins. Ergosterol is an organic, sterol - type compound locating in the cell membrane of the fungus, and a fast, highly sensitive, easily reproducible gas-chromatographic and mass-spectrometric method (GC/MS) was worked out for its qualitative and quantitative determination. The close correlation between the ergosterol content measured by the GC/MS method and DON content determined by the RP-HPLC method proves that a given wheat lot can be classified using the prediction based on the ergosterol assay. I meant to justify the relevance of the quality classes proposed by Schnürer, (edible, fodder, compulsory mycotoxin monitoring, combustible) which are exclusively based on the ergosterol content, by examining the connection between the visually determined grain contamination, and the DON and ergosterol content. My measurement results showed close correlation among the three examined parameters, which clearly proves the relevance of the quality classes. The quality system justified by us also contains information about the mycotoxin contamination during the mill receipt of cereals, so it enables us to decide whether to utilize or store separately the cereal lot. Our method for prediction of the fungal biomass based on the fast determination of ergosterol content, like the French standardisation, seems suitable for being accredited also in Hungary.

The GC/MS testing of different *Fusarium* species makes possible to draw certain conclusions concerning their relatedness based on the fatty acid profile. In this respect, we cannot rely on the sterol-type compounds, because no species-specific steroid was found in the *Fusarium* species, and the ratio of the sterol components also does not differ adequately (Fig. 27-29). Fatty acids are different in this respect. The tetracosan acid/docosane acid rate of *F. graminearum* and *F. culmorum*, which belong to the *Discolor* section, significantly differs from that of the species of the *Sporotrichiella* section, but also differs from that of the *F. crookwellense* and *F. sulphureum* species of the same (*Discolor*) section. The fatty acid spectrum of *F. moniliforme* differs from that of the *F. nygamay* (*Liseola* section), but that of the latter shows similarity to the fatty acid composition of *F. sulphureum* (*Discolor* section) (Fig. 30-31). Therefore, it is probable that the taxonomical classification of certain *Fusarium* species needs a revision.

IRODALOMJEGYZÉK

Abbas, H.K., Mirocha, C.J. 1988: Production of fusarenon-X, nivalenol, and zearalenone by *Gibberella zeae* isolates, and their toxicity in fibroblasts and rats. *Mycotoxin Res.* 4: 67-74

Abouzied, M.M., Azcona, J.I., Braselton, W.E., Pestka, J.J. 1991: Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 672-677

Anderson, P., Davidson, C.M., Littlejohn, D., Ure, A.M. 1994: Extraction of ergosterol from peaty soils and determination by high performance liquid chromatography. *Talanta*, 41: 711-720

Arthur, J.C., 1890: Wheat Scab. *Indiana. Agr. Exp. Sta. Bull.* 36: 129-132

Axelsson, B-O., Saraf, A., Larsson, L. 1995: Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 666: 77-84

Bagneris, R.W., Gaul, J.A., Ware, G.M. 1986: Liquid chromatographic determination of zearalenon and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 894-898

Banotai, C., Greene-McDowell, D.M., Azcona-Olivera, J., Pestka, J.J. 1999: Effects of intermittent vomitoxin exposure on body weight, immunoglobulin levels and heamaturia in the B6C3F (1) mouse. *Food and Chem. Toxicol.* 37: 343-350

Baxter, J.A., Terhune, S.T., Qureshi, S.A. 1983: Use of chromotropic acid for improved thin-layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins. *J. Chromatogr.* 261: 130-133

Benett, J.W. 1995: From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1), S917-S924

Becker, M., Degelmann, P., Herderich, M., Schreier, P., Humpf, H.U. 1998: Column liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. *J. Chromatogr. A*, 818: 260-264

Böhs, B., Seidel, V., Lindner, W. 1995: Analysis of selected mycotoxins by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 41: 631-637

Börjesson, T., Stöllman, U., Schnürer, J. 1990: Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3705-3710

Canet, C. 1993: Importance of international cooperation in food safety. *Food Addit. Contam.* 10: 97

Caron, D. 1995: Les fongicides contre la fusariose des épis. Pourquoi leur efficacité est elle seulement moyenne. *Perspectives Agricoles*, 198: 80-82

Chelkowski, J. 1989: *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam: Elsevier, 1989, p 179

Chu, F.S. 1984: Immunoassays for analysis of micotoxins. *J. of Food Protection*, 47: 562-569

Cohen, H., Boutin-Muma, B. 1992: Fluorescence detection of trichothecene mycotoxins as coumarin-3-carbonyl chloride derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr.* 595: 143-148

Corneli, S., Maragos, C.M. 1998: Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence method for the mycotoxin ochratoxin A. *J. of Agric. and Food Chem.* 46: 31162-3165

Croteau, S.M., Prelusky, D., Trenholm, H. 1994: Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. *J. Agric. Food Chem.* 42: 928-933

Daugenet, G., Caron, D., Maumene, C. 1991: La fusariose des épis. Perspectives Agricoles 164: 46-49

Élelmezési Ipar, 2000: Fusarium mikotoxinok élelmiszerekben és takarmányokban. Flair-flow Europe, LIV/ 9, 276

Frisvad, J.C., Thrane, U. 1987: Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal based on alkylphenone retention indices and- via spectra (diode array detection). J. Chromat. 404: 195-214

Gleissenthal, J.L., Dietrich, R., Martlbauer, E., Schuster, M., Süss, A., Terplan, G. 1989: A survey on the occurrence of Fusarium mycotoxins in Bavarian cereals from the 1987 harvest. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 188: 521-526

Glenn, A., Shotwell, B., Shotwell, O.L. 1990: Criteria for determining purity of Fusarium mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 270-275

Hart, L.P., Pesstka, J.J., Liu, M.T. 1984: Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with Gibberella zeae. Phytopathology 74: 1415-1418

Hetmanski, M.T., Scudamore, K.A. 1991: Detection of zearalenone in cereal extracts using high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. J. Chromatogr. 588: 47-52

Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., Skaar, T., Russo, I., Clarke, R. 1999: Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. British J. Cancer 80: 1682-1688

Ikedibi, C.O., Hsu, I.C., Bamberg, J.R., Strong, F.M. 1971: Gas-liquid chromatography of mycotoxins of the trichothecene group. Anal. Chem. 43: 327-340

Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. 1981: Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.* 53: 1298

Kamimura, H., Nishijima, M., Yasuda, K., Saito, K., Ibe, A., Nagayama, T., Ushiyama, H., Naoi, Y. 1981: Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 1067-1073

Kaveri, S.V., Fremy, J-M., Lapeyre, C., Strosberg, A.D. 1987: Immunodetection and immunopurification of aflatoxins using a high affinity monoclonal antibody to aflatoxin B1. *Letters in Appl. Microbiol.* 4: 71-75

Kiessling, K-H. 1988: A first line defence in animals against mycotoxins. *Mycotoxins and Phycotoxins* 88: 119-125

Kock, J.L.F., Botha, A. 1996: Fatty acids in fungal taxonomy, in Frisvad, J.C., Bridge, P.D., Arora, D.K. (eds): *Chemical fungal taxonomy* Marcel Dekker Inc., 219-246

Lamper, Cs., Téren, J., Bartók, T., Komoróczy, R., Mesterházy, Á. and Sági, F. 2000: Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of the ergosterol content. *Cer. Res. Comm.* 28: 337-344

Lauren, D.R., Agnew, M. P.1991: Multitoxin screening method for *Fusarium* mycotoxins in grains. *J. Agr. Food Chem.* 39: 502-507

Lauren, D.R., Greenhalgh, R. 1987: Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70: 479-483

Li, S., Marquardt, R.R., Abramson, D. 2000: Immunochemical detection of molds: A review. *J. of Food Protec.* 63: 281-291

Malone, B.R., Humphrey, C.W., Romer, T.R., Richard, J.L. 1998: One-step solid -phase extraction cleanup and fluorometric analysis of deoxynivalenol in grains. *J. AOAC International* 81: 448-452

Marasas, W.F.O., Schalk, J. van Rensburg and Mirocha, C.J. 1979: Incidence of *Fusarium* species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *J. Agric. Food Chem.* 27: 1108-1112

Maupetit, P., Gatel, F., Cahagnier, B., Botorel, G., Charlier, M., Collet, B., Dauvillier, P., Laffiteau, J., Roux, G. 1993: Quantitative estimation of fungal infestation of feedstuffs by determining ergosterol content. 44th. Annual Meeting of the EAAP, Aarhus, Denmark, 16-19 August, 1993

Mesterházy, Á. 1974a: *Septoria nodorum* a búza új kórokozója hazánkban. *Növényvédelem*, 10: 2998-303

Mesterházy, Á. 1977: Reaction of winter wheat varieties to four *Fusarium* species. *Phytopath. Z.* 90: 104-112

Mesterházy, Á. 1981: The role of aggressiveness of *Fusarium graminearum* isolates in the inoculation tests on wheat in seedling state. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, 16:281-292

Mesterházy, Á. 1984: *Fusarium* species of wheat in south Hungary, 1970-1983. *Cer. Res. Comm.* 12: 167-170

Mesterházy, Á. 1986: Kalászfuzariózissal szembeni ellenállóság őszi búzában. *Növénytermelés*, 35: 407-416

Mesterházy, Á. 1990a: Faktoren der *Fusarium* resistenz des Weizens. Symp. 100 Jahre Getreidezüchtung in Bernburg-Hadmersleben. *Tagungsberichte*, 288: 231-238

Mesterházy, Á. 1993: A mikotoxin kérdés Magyarországon, különös tekintettel a *Fusarium* genusra. OMFB tanulmánykötet, 49 pp.

Mesterházy, Á., Bartók, T., Téren J. 1995: Resistance of cereals to *Fusarium* in relation with the toxin contamination and occurrence of *Fusarium* toxins in South-Hungary. 9th

World Congress of Food Science and Technology, July 30-August 4, 1995 Budapest, Hungary

Mesterházy, Á. 1995: Types and components of resistance against *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386

Mesterházy, Á., Bartók, T. 1996: Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer* 49/1996, 2

Mesterházy, Á., Bartók, T., Lamper, Cs. 2001: Influence of cultivar resistance, epidemic severity, aggressiveness of *Fusarium* isolates and weather on the efficacy of fungicides against *Fusarium* head blight and DON contamination in wheat. *Plant Disease* (megjelenés alatt)

Miedaner, T., Gang, G., Schilling, A.G., Geiger, H.H. 1997: Aggressiveness and mycotoxin production of populations of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in winter rye. *Cer. Res. Commun.* 25: 471-475

Miller, J.D., Young, J.C., Trenholm, H.L. 1983: *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Can. J. Bot.* 61: 3080-3087

Molto, G., Samar, M.M., Resnik, S., Martinez, E.J., Pacin, A. 2000: Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: A preliminary exposure assessment. *Food Additives and Contaminants* 17: 809-813

Nakagawa, H.O., Gogho, H., Nishio, K., Watanabe, S. 1966: Nature and inheritance of ear scab resistance in wheat. I. Heritability estimates and heritable relationship of ear scab resistance and some agronomic characters in F₂ of the cross Shinchu naga x Norin 12. *Tokai Nogyo Shi. Ken. Hokk. Bull.* 15: 43-54

Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J., 1981: *Fusarium diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State Univ. Press. University Park , 457

Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. 1983: *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State Univ. Press. University Park, 193

Newell, S.Y., Arsuffi, L.T., Fallon, R.D. 1988: Fundamental procedures for determining ergosterol content in decaying plant material by liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1876-1879

Newell, S.Y. 1992: Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In Carroll, G.C. and Wicklow, D.T. (eds.) *The Fungal Community-Its Organisation and Role in the Ecosystem*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong. pp. 521-561

Nirenberg, H.I. 1989: Identification of *Fusaria* occurring in Europe on cereals and potatoes. in Chelkowski, J. (eds): *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* Elsevier 179-183

Parry, D., 1993: The complex cereal *Fusarium* complex. Meeting of the Eur. *Fusarium* Network, Vienna, Febr.11-12, Abstr.

Parry, D.W., Jenkinson, P., L. McLeod. 1995: *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals- a review. *Plant Pathology* 44: 207-238

Paterson, R.M. 1996: Chemotaxonomy of fungi by unsaponifiable lipids. in Frisvad, J.C., Bridge, P.D., Arora, D.K. (eds): *Chemical fungal taxonomy* Marcel Dekker Inc. 183-218

Peacock, G.A., Goosey, M.W. 1989: Separation of fungal sterols by normal-phase high performance liquid chromatography. Application to the evaluation of ergosterol biosynthesis. *J. Chromatogr.* 469: 293-304

Petzinger, E. and Ziegler, K. 2000: Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Therapeutics* 23: 91-98

Rao, B.S., Rao, V.S., Ramakrishna, Y., Bhat, R.V. 1989: Rapid and specific method for screening ergosterol as an index of fungal contamination in cereal grains. *Food Chem.* 31: 51-56

Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J., Luf, W. 1999: Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *J. Chromatogr.* 854: 45-55

Rizzo, A.F., Saari, I., Lindfors, E. 1986: Derivatization of trichothecenes and water treatment of their trimethylsilyl ethers in an anhydrous apolar solvent. *J. Chromatogr.* 368: 381-386

Romer, T.R. 1986: Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 699-703

Rood, H.D.JR., Buck, W.B., Swanson, S.P. 1988b: Diagnostic screening method for the determination of trichothecene exposure in animals. *J. Agric. Food Chem.* 36: 74-79

Rotter, B.A., Prelosky, D.B. 1996: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, 48: 1-34

Sano, A., Asabe, Y., Takitani, S., Ueno, Y. 1982: Fluorodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with nicotinamide and 2-acetylpyridine on a silica gel layer. *J. Chromatogr.* 235: 257-265

Saraf, A., Larsson, L., Burge, H., Milton, D. 1997: Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: Comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* Amebocyte Lysate Assay. *Appl. Environm. Microbiol.* 2554-2559

Sashidhar, R.B., Sudershan, R.V., Ramakrishna, Y., Nahdi, S., Bhat, R.V. 1988: Enhanced fluorescence of ergosterol by iodination and determination of ergosterol by fluorodensitometry. *Analyst (London)* 113: 809-812

Schmidt, R., Ziegenhagen, E., Dose, K. 1981: High-performance liquid chromatography of trichothecenes. *J. Chromatogr.* 212: 370-373

Schnürer, J. 1993: Comparison of methods for estimating the biomass of three food borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 552-555

Schnürer, J. 1995: Detection and qualification of fungi in foods. Proceedings from the Workshop Fungal Identification Techniques. Barcelona, 5 to 8 April 1995. 153-159

Schwandorf, K., Müller, H-M. 1989: Determination of ergosterol in cereals mixed feed components and mixed feeds by liquid chromatography. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 72: 457-462

Scott, P.M. 1982: Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65: 876-883

Scott, P.M. 1984: Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Protection*, 47: 489-499

Scott, P.M. 1991: Mycotoxins. General referee reports. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 120-128

Seitz, L.M., Mohr, H.E., Burroughs, R., Sauer, D.B. 1977: Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* 54: 1201-1217

Seitz, L.M., Sauer, D.B., Burroughs, R., Mohr, H.E., Hubbard, J.D. 1979: Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopatology*, 69: 1202-1203

Sheshthavi, El. M., Mesterházy, Á. 1974: Védekezési kísérletek fungicidekkel a *Fusarium graminearum* Schwabe ellen őszi búzában. *Növényvédelem*, 10: 350-355

Sharma, A. 1998: Mycotoxins: risk evaluation and management in radiation-processed foods. in Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (eds): Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, Marcel Dekker Inc. 435-457

Scott, D.B., Jager, E.J.H., WYK, P.S., 1988: Head blight of irrigated wheat in South Africa, *Phytophylactica*, 20: 317-319

Smalley, E.B., Strong, F.M. 1974: Toxic trichotecenes. In: Purchase, I.F.H. Mycotoxins. Elsevier, Amsterdam 199-228

Soo, L.U., Jang, H.S., Tanaka, T., Oh, Y.J., Cho, C.M., Ueno, Y. 1987: Effect of milling on decontamination of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in Korean wheat. *J. Agr. Food. Chem.* 35: 126-129

Swanson, S.P., Terwel, L., Corley, R.A., and Buck, W.B. 1982: Gas chromatographic method for the determination of diacetoxyscirpenol in swine plasma and urine. *J. Chromatogr.* 248: 456-460

Sweeney, M.J., Dobson, A.D. W. 1999: Molecular of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163

Szécsi, Á., Bartók, T. 1995: Trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from corn in Hungary. *Mycotoxin Res.* 11: 85-92

Szunics, Lu., Szunics, L., Stéhli, L., 1987: A búzáról izolált mikroorganizmusok és kártételük ismertetése. IV. Adatok a *Fusarium* okozta kártétel kialakulásához. *Növénytermelés*, 36: 421-430

Szüts, P., Mestreházy, Á., Bartók, T., Falkay, Gy., Melis, K., Földesi, I., Vastagh, I., Szirovicza, É. 1994: Korai izolált telarche „járvány” Dél-Magyarországon. A táplálkozási faktorok lehetséges szerepe. *Gyermekegyógyászat*, 5: 402-409

Takitani, S., Asabe, Y., Kato, T., Suzuki, M., Ueno, Y. 1979: Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl) pyridine on silica gel thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.* 172: 335-342

Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., Ueno, Y. 2000: Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 882: 23-28

Téren, J., Draskovics, I., Novák, E.K. 1990: Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. MÉTE, Budapest

Tiemann, R., Berg, D., Kramer, W., Pontzen, R. 1997: Biochemistry of the New Fungicide KWG 4168 (Spiroxamine). *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 50: 29-48

Trenholm, H.L., Warner, R.M., Prelusky, D.B. 1985: Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 645-649

Varga, J. 1999: Fejezetek a mikrobiológiából. JATE TTK, Mikrobiológiai tanszék (egyetemi jegyzet)

Varga, J., Téren, J. 1999: Recent progress in mycotoxin research. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 46: 233-243

Varga, J., Rigó, K., Bartók, T., Lamper, Cs., Téren, J. 2001/a: Examination of ochratoxin production in *Aspergillus albertensis*. British Mycological Society, International Symposium, Univ. of Wales Swansea, 22-27th April,

Varga, J., Rigó, K., Téren, J., Lamper, Cs., Szabó, G. 2001/b: Examination of ochratoxin a production in different *Aspergillus* species. *Mycopathologia* (előkészületben)

Ware, G.M., Francis, O.J., Carman, A.S., Kuan, S.S. 1986: Gas chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat with electron capture detection: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 899-901

Weete, J.D., Gandhi, S.R. 1999: Sterols and fatty acids of the Mortierellaceae: taxonomic implications. *Mycologia*, 91: 642-649

Wolf-Hall, C.E., Hanna, M.A., Bullerman, L.B. 1999: Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods. *J. Food Protection* 62: 962-964

Xu, S. Norton, R.A., Crumley, F.G., Nes, W.D. 1988: Comparison of the chromatographic properties of sterols. Select additional steroids and triterpenoids: gravity-flow column liquid chromatography, thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 452: 377-398

Young, J.C., Fulcher, R.G., Hayhoe, J.H., Scott, P.M., Dexter, J.E. 1984: Effects of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats. *J. Agric. Food Chem.* 32: 659-664

Young, J.C. 1995: Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2904-2910

Zill, G., Engelhardt, G., Wallnoefer, P.R. 1988: Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 187: 246-249

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Mesterházy Ákos tudományos tanácsadónak, valamint Dr. Téren József főtanácsos, Bartók Tibor (szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht) laboratórium vezető és Dr. Sági Ferenc nyugalmazott tudományos tanácsadó Uraknak dolgozatom elkészítéséhez nyújtott értékes szakmai támogatásukért.